

## · 基础研究 ·

# 杜仲多糖通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路减轻 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞损伤

李宁博<sup>1</sup>, 骆晓飞<sup>2</sup>, 尹夏<sup>1</sup>, 魏瑄<sup>2</sup>

(1.河南中医药大学第一附属医院骨科,河南 郑州 450000;2.郑州市骨科医院骨科,河南 郑州 450000)

**【摘要】** 目的:探讨杜仲多糖对白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导的软骨细胞损伤的影响及可能机制。方法:体外培养小鼠软骨细胞 ATDC5,用含 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$  处理 ATDC5 制作骨关节炎软骨细胞炎症模型,随机分为空白组、模型组、模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组。其中空白组细胞用常规培养基培养,模型组细胞用含 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$  的培养基培养,模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组细胞分别用含 100、200、400  $\mu$ g/ml 杜仲多糖与 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$  的培养基共同培养。分别培养 24、48、72 h 后,CCK-8 法检测细胞活力。培养 48 h 后,流式细胞术和 DAPI 染色检测细胞凋亡,ELISA 法检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),一氧化氮(nitric oxide, NO), $\gamma$  干扰素(interfero- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)的表达,DCFH-DA 法检测细胞中活性氧含量,Western-blot 法检测金属蛋白酶组织抑制因子 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1), 基质金属蛋白酶 13 (mitochondrial membrane potential, MMP-13)及 NF- $\kappa$ B 信号通路相关 P65,磷酸化 P65(p-P65)的蛋白表达,免疫荧光染色观察 NF- $\kappa$ B P65 细胞定位。结果:与空白组比较,模型组 ATDC5 细胞活力及 TIMP-1 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),细胞凋亡率, TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 水平, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, MMP-13 和 p-P65 的蛋白表达及细胞核内 P65<sup>+</sup>数量均升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组 ATDC5 细胞活力及 TIMP-1 蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),而细胞凋亡率、TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 水平、ROS 含量、MMP-13 和 p-P65 的蛋白表达及细胞核内 P65<sup>+</sup>数量均降低( $P < 0.05$ )。结论:杜仲多糖可促进白细胞介素 1 $\beta$  诱导的软骨细胞 ATDC5 增殖,并抑制其凋亡、炎症反应和基质降解,其作用机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活有关。

**【关键词】** 杜仲多糖; 软骨细胞; 细胞凋亡; 炎症; NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号:R684.3

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2022.07.013

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide reduces the injury of IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte by inhibiting NF- $\kappa$ B pathway** LI Ning-bo, LUO Xiao-fei\*, YIN Xia, and WEI Xuan. \*Department of Orthopaedics, Zhengzhou Orthopaedics Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of *Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide on the injury of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-induced chondrocyte and its possible mechanism. **Methods:** ATDC5 was treated with 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$  to establish osteoarthritis chondrocyte inflammation model, mouse chondrocyte ATDC5 were cultured in vitro and randomly divided into blank group, model group, model+*Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide low concentration group, model+*Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide medium concentration group and model+*Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide high concentration group. The cells in the blank group were cultured with conventional medium; the cells in the model group cells were cultured with a medium containing 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$ , and the cells in the model+*Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide low concentration group, model+*Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide medium concentration group and model+*Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide high concentration group were co-cultured with medium containing 100, 200, 400  $\mu$ g/ml *Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharide and 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$ . After the cells of each group were cultured for 24 h, 48 h and 72 h, CCK-8 method was used to detect cell viability. After the cells of each group were cultured for 48 h, flow cytometry and DAPI staining were used to detect cell apoptosis; ELISA method was used to detect the expression of TNF- $\alpha$ , NO, IFN- $\gamma$  and IL-6 in cells; DCFH-DA method was used to detect the content of ROS in cells; Western blot was used to detect the protein expression

基金项目:2018 年河南省科技攻关项目(编号:182102310183)

Fund program:2018 Henan Science and Technology Research Project (No.182102310183)

通讯作者:骆晓飞 E-mail:luoxiaofei152@163.com

Corresponding author:LUO Xiao-fei E-mail:luoxiaofei152@163.com

of TIMP-1, MMP-13 and NF- $\kappa$ B signaling pathway-related P65 and p-P65; Immunofluorescence staining was used to observe the localization of NF- $\kappa$ B P65 cells. **Results:** Compared with the blank group, the ATDC5 cell viability and the protein expression of TIMP-1 in the model group reduced ( $P<0.05$ ), while apoptosis rate, the levels of TNF- $\alpha$ , NO, IFN- $\gamma$  and IL-6, the content of ROS, the protein expression of MMP-13 and p-P65, and the number of P65<sup>+</sup> in the nucleus increased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the ATDC5 cell viability and the protein expression of TIMP-1 in the model+Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide low concentration group, model+Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide medium concentration group and model+Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide high concentration group increased ( $P<0.05$ ), while apoptosis rate, the levels of TNF- $\alpha$ , NO, IFN- $\gamma$  and IL-6, the content of ROS, the protein expression of MMP-13 and p-P65, and the number of P65<sup>+</sup> in the nucleus reduced ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The results showed that Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide could promote proliferation of IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte ATDC5 and inhibit its apoptosis, inflammatory response and matrix degradation. Its mechanism may be related to the inhibition of the activation of NF- $\kappa$ B pathway.

**KEYWORDS** Eucommia polysaccharides; Chondrocytes; Apoptosis; Inflammation; NF- $\kappa$ B signaling pathway

骨关节炎是一种以关节软骨退变个关节腔炎症为主要病理变化的慢性关节退变疾病, 严重威胁人类尤其是老年人的生命健康。目前, 骨关节炎的治疗药物主要为非甾体类抗炎镇痛药物, 这类药物可缓解早期症状, 但长期服用具有较多不良反应<sup>[1]</sup>。因此, 需要寻找高效且副作用小的治疗骨关节炎的药物。骨关节炎的发病机制尚未明确。软骨细胞是软骨内惟一存在的细胞成分, 在维持软骨的正常功能和形态中起重要作用<sup>[2]</sup>。研究表明, 软骨细胞损伤是骨关节炎发生发展的重要原因<sup>[3]</sup>, 降低或抑制软骨细胞的损伤对于骨关节炎的治疗尤为重要。杜仲多糖是中药杜仲的主要活性成分, 具有抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗疲劳<sup>[5]</sup>、降血糖和血脂<sup>[6]</sup>等功效。研究还显示, 杜仲多糖可有效抑制脂多糖诱导的脓毒症小鼠炎症细胞因子的表达, 减轻小鼠肺损伤<sup>[7]</sup>; 杜仲多糖可通过抑制心肌缺血再灌注兔氧化应激, 减轻兔心肌缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>。但目前, 杜仲多糖对骨关节炎软骨细胞损伤的影响还未知。因此, 于 2019 年 10 月至 2020 年 6 月以小鼠软骨细胞 ATDC5 为研究对象, 旨在观察杜仲多糖对白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 诱导的 ATDC5 细胞凋亡、炎症反应和基质降解的影响, 以期防治软骨细胞损伤、治疗骨关节炎提供一定的实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验细胞、试剂和仪器

小鼠软骨细胞株 ATDC5 (美国 ATCC); 杜仲多糖 (宁陕国圣生物科技有限公司, 批号 20191108); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (浙江天杭生物科技股份有限公司, 批号 20191026); DMEM 培养基, 细胞计数试剂盒-8 (cell-counting-kit-8, CCK-8), Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒和二喹甲胺 (bicinchoninic-acid, BCA) 蛋白检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 20191008、20191108、20191205、20191115); 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 一氧化氮 (netric oxide,

NO), 干扰素  $\gamma$  (interfero- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20200512、20200211、20191208、20200125、20191216); 基质金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1), 基质金属蛋白酶-13 (mitochondrial membrane protential-13, MMP-13) 和  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 单克隆抗体 (北京中杉金桥生物试剂公司, 批号分别为 TA327965、TA506697、TA-09); P65, p-P65 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 sc-8008、sc-136548); MCO-18AC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, 日本 SANYO 公司; HBS-1096B 型酶标仪, 南京德铁实验设备公司; FlowSight 流式细胞仪, 美国 Merck Millipore 公司; TS100 荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; ChemiDoc TM MP 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 ATDC5 细胞培养和分组处理

复苏 ATDC5 细胞, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。当细胞生长密度至 80% 左右时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行传代培养。ATDC5 细胞随机分为空白组、模型组、模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组。其中空白组细胞用常规培养基培养, 模型组细胞用含 10  $\mu$ g/ml<sup>[9]</sup> IL-1 $\beta$  的培养基培养, 模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组细胞分别用含 100、200、400  $\mu$ g/ml<sup>[10]</sup> 杜仲多糖与 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$  的培养基共同培养。

### 1.3 观察项目与方法

**1.3.1 CCK-8 法检测细胞活力** 将 ATDC5 细胞以  $1.0 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔板中, 按照分组处理, 分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加 10  $\mu$ l CCK-8 试剂。再孵育 2 h 后, 酶标仪 450 nm 处测光密度 (optical density, OD) 值。OD 值越大, 说明细胞活力越强。

**1.3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡** 将 ATDC5 细胞以  $5.0 \times 10^4$ /孔接种于 24 孔板中, 按分组处理, 培养 48 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞。PBS 清洗细

胞 2 次,加 500  $\mu\text{l}$  结合缓冲液,混悬细胞。加 10  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{l}$  碘化丙啶(propidium iodide, PI),混匀,室温避光孵育 15 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。细胞凋亡率(%)=[(早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数)/总细胞数] $\times 100\%$ 。

**1.3.3 DAPI 染色检测细胞凋亡** 将 ATDC5 细胞以  $5\times 10^4$ /孔接种于 24 孔板,按分组处理,培养 48 h,弃培养基。PBS 清洗细胞 2 次,4%多聚甲醛固定细胞 25 min。PBS 清洗 2 次,加 DAPI 室温避光染色 5 min,PBS 清洗,荧光显微镜观察细胞核形态并拍照。

**1.3.4 ELISA 法检测细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 水平** 将 ATDC5 细胞以  $5.0\times 10^4$ /孔接种于 24 孔板中,按分组处理,培养 48 h 后,收集细胞培养上清液,3 500 r/min 离心 5 min,按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书操作,分别检测上清中 TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 水平。

**1.3.5 DCFH-DA 法检测细胞中活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量** 将 ATDC5 细胞以每孔  $5\times 10^4$  接种于 24 孔板,按分组处理,培养 48 h,弃培养基。加 1 ml 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA,培养箱中孵育 30 min。不含 FBS 培养基清洗细胞 3 次,除去未进入细胞内的 DCFH-DA。然后荧光显微镜观察并拍照,激发波长为 502 nm,发射波长为 530 nm,结果以荧光度值表示,荧光度值与细胞内 ROS 水平呈正比。

**1.3.6 Western-blot 检测细胞中 TIMP-1、MMP-13 及 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路相关蛋白表达** 将 ATDC5 细胞以每孔  $5\times 10^4$  接种于 24 孔板中,按照分组处理,培养 48 h 后,0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞。RIPA 试剂提取细胞中总蛋白,BCA 法定量后,行 10%SDS-PAGE 电泳。电泳后,转至 PVDF 膜,并于 5%脱脂奶粉溶液中室温封闭 1 h。然后分别置于兔抗小鼠 TIMP-1(1:500)、MMP-13(1:500)、P65(1:1 000)、p-P65(1:1 000)和  $\beta$ -actin(1:1 000)一抗孵育液中,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。在置于 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:2 000)孵育液中,室温孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。最后加化学发光试剂,避光显影,凝胶成像系统曝光拍照,Image J 软件分析目的蛋白 TIMP-1、MMP-13、P65 和 p-P65 相对于  $\beta$ -actin 的表达量。

**1.3.7 免疫荧光检测核转录因子(nuclear transcription factor- $\kappa\text{B}$ ,NF- $\kappa\text{B}$ )P65 细胞定位** 将 ATDC5 细胞以每孔  $5\times 10^4$  接种于 24 孔板中,按照分组处理,培养 48 h 后,0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞,制备细胞爬片。置于 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 3 次,加 0.5% Triton X-100 室温放置 20 min。PBS 清洗 3 次,自然晾干后,加 1%BSA 封闭液,室温封闭

30 min。然后滴加兔抗小鼠 NF- $\kappa\text{B}$  P65 一抗(1:50),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。滴加荧光标记的羊抗兔二抗(1:200),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。避光加 DAPI 孵育 5 min,封片固定,荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件分析实验数据。符合正态分布的定量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。细胞活性数据采用重复测量方差分析,空白组和模型组两组间比较用独立样本  $t$  检验。模型组、模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$ 诱导的 ATDC5 细胞活力的影响

与空白组比较,模型组 48 h 和 72 h 的 ATDC5 细胞活力明显降低,而培养 24 h 的 ATDC5 细胞活力无明显变化。与模型组比较,模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组 48 h 和 72 h 的 ATDC5 细胞活力均升高,而培养 24 h 的 ATDC5 细胞活力无明显变化。见表 1。

### 2.2 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$ 诱导的 ATDC5 细胞凋亡的影响

与空白组比较,模型组 ATDC5 细胞凋亡率升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组 ATDC5 细胞凋亡率降低( $P<0.05$ )。DAPI 染色结果显示,模型组可见大量 ATDC5 细胞的细胞核发生碎裂,模型+杜仲多糖低浓度组有极少量细胞核发生碎裂,而空白组、模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组 ATDC5 细胞核形态无明显变化。见图 1,表 2。

### 2.3 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$ 诱导的 ATDC5 细胞培养上清中炎症因子表达的影响

与空白组比较,模型组 ATDC5 细胞培养上清中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 的表达均升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组 ATDC5 细胞培养上清中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 的表达均降低( $P<0.05$ )。见表 3。

### 2.4 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$ 诱导的 ATDC5 细胞 ROS 含量的影响

与空白组比较,模型组 ATDC5 细胞中 ROS 含量升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖



表 1 不同浓度杜仲多糖对 IL-1β 诱导的 ATDC5 细胞活性的影响 (n=9, x̄±s)

Tab.1 Effects of different concentrations of Eucommia ulmoides polysaccharides on the viability of ATDC5 cells induced by IL-1β (n=9, x̄±s)

组别	细胞活性(OD450)		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0.24±0.03	0.55±0.05	1.08±0.08
模型组	0.21±0.02	0.32±0.06	0.43±0.07
模型+杜仲多糖低浓度组	0.22±0.03	0.39±0.05	0.74±0.06
模型+杜仲多糖中浓度组	0.23±0.04	0.41±0.05	0.82±0.08
模型+杜仲多糖高浓度组	0.22±0.02	0.44±0.06	0.95±0.08

注:空白组和模型组间比较  $F=70.142, P<0.05$ ; 空白组和模型组不同时间点比较,  $F=70.335, P<0.05$ ; 时间和分组之间具有交互作用,  $F=35.578, P<0.05$ ; 两组比较 48 h 和 72 h 时间点差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。模型组、模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组组间比较,  $F=139.355, P<0.05$ ; 空白组和模型组不同时间点比较,  $F=559.136, P<0.05$ ; 时间和分组之间具有交互作用,  $F=40.114, P<0.05$

Note: Comparison between blank group and model group  $F=70.142, P<0.05$ ; Comparison between blank group and model group at different time points,  $F=70.335, P<0.05$ ; There is an interaction between time factor and grouping,  $F=35.578, P<0.05$ ; Pairwise comparison showed that the difference between 48 h and 72 h time points was statistically significant ( $P<0.05$ ). Comparison between model group, model + eucommia polysaccharide low concentration group, model + eucommia polysaccharide medium concentration group and model + eucommia polysaccharide high concentration group  $F=139.355, P<0.05$ ; comparison between blank group and model group at different time points,  $F=559.136, P<0.05$ ; There is an interaction between time factor and grouping,  $F=40.114, P<0.05$

高浓度组 ATDC5 细胞中 ROS 含量降低 ( $P<0.05$ )。见图 2, 表 4。

表 2 流式细胞术检测不同浓度杜仲多糖对 IL-1β 诱导的 ATDC5 细胞凋亡率的影响 (n=9, x̄±s)

Tab.2 Flow cytometry to detect the effects of different concentrations of Eucommia ulmoides polysaccharides on IL-1β-induced ATDC5 cell apoptosis (n=9, x̄±s)

组别	细胞凋亡率 (%)
空白组	6.34±0.85
模型组	8.67±0.72 <sup>a</sup>
模型+杜仲多糖低浓度组	21.34±3.41 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖中浓度组	16.21±3.18 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖高浓度组	12.78±2.28 <sup>b</sup>

注:与空白组比较,  $t=6.275, P<0.01$ ; 模型组, 模型+杜仲多糖低浓度组, 模型+杜仲多糖中浓度组, 模型+杜仲多糖高浓度组单因素方差分析,  $^bF=37.764, P<0.05$

Note: Compared with the blank group,  $t=6.275, P<0.01$ ; Model group, model + Eucommia polysaccharide low concentration group, model + Eucommia polysaccharide medium concentration group, model + Eucommia polysaccharide high concentration group one-way analysis of variance,  $^bF=37.764, P<0.05$

## 2.5 杜仲多糖对 IL-1β 诱导的 ATDC5 细胞 TIMP-1 和 MMP-13 蛋白表达的影响

与空白组比较, 模型组 ATDC5 细胞中 MMP-13 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ), TIMP-1 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )。与模型组比较, 模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组 ATDC5 细胞中 MMP-13 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ), TIMP-1 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )。见图 3, 表 5。

## 2.6 杜仲多糖对 IL-1β 诱导的 ATDC5 细胞 NF-κB 信号通路影响

与空白组比较, 模型组 ATDC5 细胞中 p-P65 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ), P65 蛋白表达无显著变化 ( $P>$

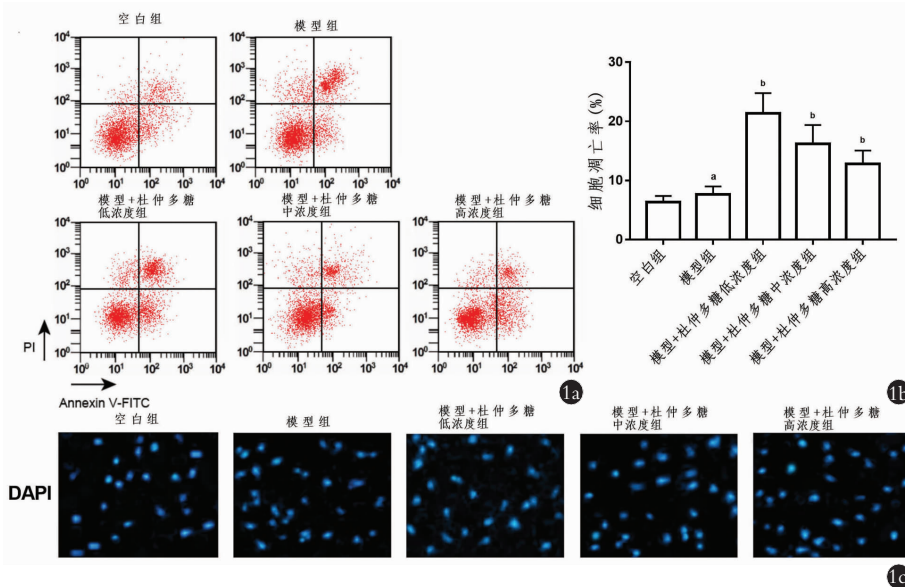


图 1 杜仲多糖对 IL-1β 诱导的 ATDC5 细胞凋亡的影响 1a. 流式细胞术检测各组细胞凋亡 1b. 各组细胞凋亡率 1c. DAPI 染色检测各组细胞凋亡: 与空白组比较,  $^aP<0.05$ ; 与模型组相比较,  $^bP<0.05$

Fig.1 The effect of Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide on IL-1β-induced apoptosis of ATDC5 cells 1a. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis in each group 1b. Cell apoptosis rate in each group 1c. DAPI staining was used to detect cell apoptosis in each group. Compared with the blank group,  $^aP<0.05$ ; compared with the model group,  $^bP<0.05$

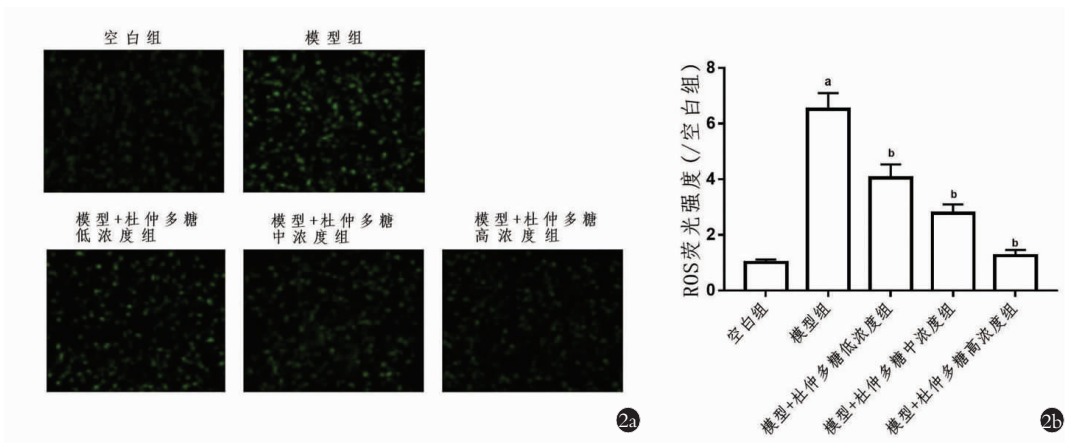
**表 3** 不同浓度杜仲多糖对 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞培养上清中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 表达的影响 (n=9,  $\bar{x}\pm s$ , mg/L)

**Tab.3** Effects of different concentrations of Eucommia ulmoides polysaccharides on the expression of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , NO, IFN- $\gamma$  and IL-6 in the culture supernatant of ATDC5 cells induced by IL-1 $\beta$  (n=9,  $\bar{x}\pm s$ , mg/L)

组别	TNF- $\alpha$	NO	IFN- $\gamma$	IL-6
空白组	62.36 $\pm$ 8.48	86.38 $\pm$ 12.27	52.36 $\pm$ 5.68	82.36 $\pm$ 8.56
模型组	298.28 $\pm$ 38.26 <sup>a</sup>	593.79 $\pm$ 45.41 <sup>a</sup>	236.57 $\pm$ 25.69 <sup>a</sup>	526.35 $\pm$ 55.36 <sup>a</sup>
模型+杜仲多糖低浓度组	207.17 $\pm$ 34.71 <sup>b</sup>	468.57 $\pm$ 41.20 <sup>b</sup>	189.36 $\pm$ 16.57 <sup>b</sup>	426.36 $\pm$ 44.56 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖中浓度组	146.31 $\pm$ 28.55 <sup>b</sup>	336.58 $\pm$ 25.63 <sup>b</sup>	152.36 $\pm$ 15.69 <sup>b</sup>	307.59 $\pm$ 30.25 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖高浓度组	112.56 $\pm$ 9.68 <sup>b</sup>	189.75 $\pm$ 25.63 <sup>b</sup>	82.354 $\pm$ 10.36 <sup>b</sup>	246.25 $\pm$ 18.69 <sup>b</sup>

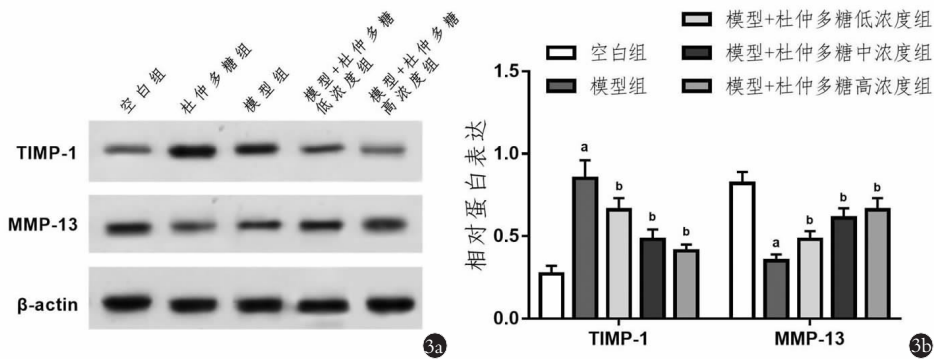
注:与空白组比较,  $t_{TNF-\alpha}=18.060, t_{NO}=32.361, t_{IFN-\gamma}=32.361, t_{IL-6}=32.361, ^aP<0.05$ ; 模型组, 模型+杜仲多糖低浓度组, 模型+杜仲多糖中浓度组, 模型+杜仲多糖高浓度组单因素方差分析,  $F_{TNF-\alpha}=11.850, ^bP<0.05, F_{NO}=213.947, ^bP<0.05, F_{IFN-\gamma}=118.372, ^bP<0.05, F_{IL-6}=88.659, ^bP<0.05$

Note: Compared with the blank group,  $t_{TNF-\alpha}=18.060, t_{NO}=32.361, t_{IFN-\gamma}=32.361, t_{IL-6}=32.361, ^aP<0.05$ ; model group, model+Eucommia ulmoides low concentration group, model+Eucommia polysaccharide medium concentration group, model+Eucommia polysaccharide high concentration group one-way analysis of variance,  $F_{TNF-\alpha}=11.850, ^bP<0.05, F_{NO}=213.947, ^bP<0.05, F_{IFN-\gamma}=118.372, ^bP<0.05, F_{IL-6}=88.659, ^bP<0.05$



**图 2** 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞中 ROS 含量的影响 **2a.** DCFH-DA 法检测各组细胞 ROS **2b.** 各组细胞 ROS 含量

**Fig.2** The effect of Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide on the content of ROS in ATDC5 cells induced by IL-1 $\beta$  **2a.** DCFH-DA was used to detect cell ROS in each group **2b.** Cell ROS content in each group



**图 3** 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞中 TIMP-1 和 MMP-13 蛋白表达的影响 **3a.** Western-blot 检测各组细胞中 TIMP-1 和 MMP-13 蛋白表达 **3b.** 各组 TIMP-1 和 MMP-13 相对蛋白表达。蛋白表达与空白组比较,  $^aP<0.05$ ; 与模型组相比较,  $^bP<0.05$

**Fig.3** The effect of Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide on the protein expression of TIMP-1 and MMP-13 in ATDC5 cells induced by IL-1 $\beta$  **3a.** Western-blot was used to detect the protein expression of TIMP-1 and MMP-13 **3b.** The protein expression of TIMP-1 and MMP-13. Compared with the blank group,  $^aP<0.05$ ; compared with the model group,  $^bP<0.05$

0.05)。与模型组比较, 模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组 ATDC5 细胞中 p-P65 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ), P65

蛋白表达无显著变化 ( $P>0.05$ )。免疫荧光染色结果显示, 模型组 NF- $\kappa$ B P65 大部分定位于细胞核中, 每个细胞核内 P65<sup>+</sup>数量高于空白组 ( $P<0.05$ ), 而与

表 4 不同浓度杜仲多糖对 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞 ROS 荧光强度含量的影响 (n=9,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab.4 Effects of different concentrations of Eucommia ulmoides polysaccharides on ROS content of ATDC5 cells induced by IL-1 $\beta$  (n=9,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	ROS 含量(∕空白组)
空白组	1.00±0.11
模型组	6.51±0.59 <sup>a</sup>
模型+杜仲多糖低浓度组	4.05±0.48 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖中浓度组	2.78±0.32 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖高浓度组	1.25±0.21 <sup>b</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup>t=27.542, P<0.01;模型组,模型+杜仲多糖低浓度组,模型+杜仲多糖中浓度组,模型+杜仲多糖高浓度组单因素方差分析,<sup>b</sup>F=245.900, P<0.05

Note:Compared with the blank group, <sup>a</sup>t=27.542, P<0.01;Model group, model+Eucommia polysaccharide low concentration group, model+Eucommia polysaccharide medium concentration group, model+Eucommia polysaccharide high concentration group one-way analysis of variance, <sup>b</sup>F=245.900, P<0.05

模型组比较,模型+杜仲多糖低浓度组、模型+杜仲多糖中浓度组和模型+杜仲多糖高浓度组每个细胞核内 P65<sup>+</sup>数量降低(P<0.05)。见图 4,表 6。

### 3 讨论

#### 3.1 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞凋亡的影响

杜仲多糖作为杜仲的主要活性成分之一,具有多种药理功效。研究显示,杜仲多糖可通过抑制肝脏中 I、III 型胶原蛋白、TIMP-1 和 TGF- $\beta$ 1 的表达来降低四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化,减轻大鼠肝损伤<sup>[11]</sup>;杜仲多糖可降低吗啡耐受小鼠脊髓中炎性因

表 5 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞中 TIMP-1 和 MMP-13 相对蛋白表达的影响 (n=9,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab.5 Effects of different concentrations of Eucommia ulmoides polysaccharides on the expression of TIMP-1 and MMP-13 proteins in ATDC5 cells induced by IL-1 $\beta$

组别	TIMP-1	MMP-13
空白组	0.27±0.05	0.82±0.07
模型组	0.85±0.11 <sup>a</sup>	0.35±0.04 <sup>a</sup>
模型+杜仲多糖低浓度组	0.66±0.07 <sup>b</sup>	0.48±0.05 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖中浓度组	0.48±0.06 <sup>b</sup>	0.61±0.06 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖高浓度组	0.41±0.04 <sup>b</sup>	0.66±0.07 <sup>b</sup>

注:与空白组比较, <sup>a</sup>t<sub>TIMP-1</sub>=14.400, <sup>a</sup>t<sub>MMP-13</sub>=17.489, P<0.05;模型组,模型+杜仲多糖低浓度组,模型+杜仲多糖中浓度组,模型+杜仲多糖高浓度组单因素方差分析, <sup>b</sup>F<sub>TIMP-1</sub>=63.027, <sup>b</sup>F<sub>MMP-13</sub>=55.333, P<0.05

Note:Compared with the blank group, <sup>a</sup>t<sub>TIMP-1</sub>=14.400, <sup>a</sup>t<sub>MMP-13</sub>=17.489, P<0.05;Model group, model+Eucommia polysaccharide low concentration group, model+Eucommia polysaccharide medium concentration group, model+Eucommia polysaccharide high concentration group one-way analysis of variance, <sup>b</sup>F<sub>TIMP-1</sub>=63.027, <sup>b</sup>F<sub>MMP-13</sub>=55.333, P<0.05

子 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达,抑制慢性吗啡耐受的进展<sup>[12]</sup>;杜仲叶多糖可有效提高免疫抑制小鼠的免疫功能,通过抑制 JNK/ERK/MAPK 信号通路对松扎模型(chronic constriction injury, CCI)诱导的神经病理性疼痛大鼠发挥镇痛作用<sup>[13]</sup>。但目前,杜仲多糖对骨关节炎软骨细胞损伤的影响还未知。本研究显示,杜仲多糖可促进 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞 ATDC5 活力,且抑制其凋亡,与付长龙等<sup>[10]</sup>报道的结果一致,提示杜仲多糖可减轻 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞

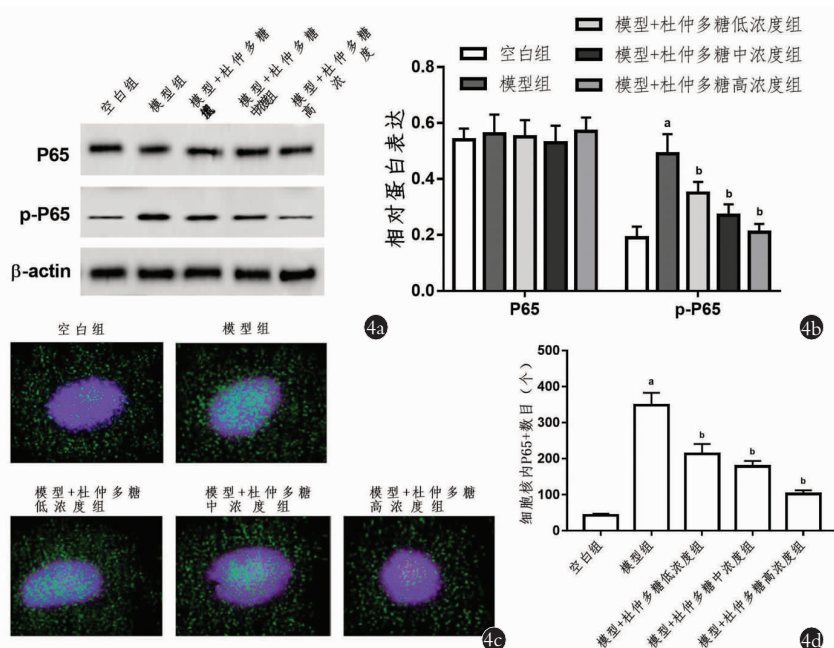


图 4 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞中 NF- $\kappa$ B 通路蛋白表达的影响 4a. Western-blot 检测 4b. 各组细胞中 P65 和 p-P65 蛋白表达 4c. 免疫荧光观察 NF- $\kappa$ B P65 和 p-P65 蛋白 4d. 各组细胞核内 P65<sup>+</sup>数目

Fig.4 The effect of Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide on the NF- $\kappa$ B pathway in ATDC5 cells induced by IL-1 $\beta$  4a. Western-blot was used to detect the protein expression of P65 and p-P65 in each group of cells 4b. The protein expression of P65 and p-P65 4c. Immunofluorescence observed the localization of NF- $\kappa$ B P65 protein and p-P65 4d. Number of P65<sup>+</sup> in nucleus of each group



表 6 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞中 NF- $\kappa$ B 通路相对蛋白表达的影响和细胞核中的 P65<sup>+</sup>数目 (n=9,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab.6 Effect of Eucommia ulmoides Oliv polysaccharide on the NF- $\kappa$ B pathway in ATDC5 cells induced by IL-1 $\beta$  and number of P65<sup>+</sup> in nucleus (n=9,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	P65 蛋白	p-P65 蛋白	细胞核中 P65 <sup>+</sup> 数量(个)
空白组	0.54 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.04	42.54 $\pm$ 5.08
模型组	0.56 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	348.65 $\pm$ 34.2 <sup>a</sup>
模型+杜仲多糖低浓度组	0.55 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	213.65 $\pm$ 27.5 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖中浓度组	0.53 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	178.54 $\pm$ 15.35 <sup>b</sup>
模型+杜仲多糖高浓度组	0.57 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	102.36 $\pm$ 10.54 <sup>b</sup>

注:与空白组比较,  $t_{P65}=0.744, t_{p-P65}=12.481, t_{P65^+}=26.560, ^aP<0.05$ ; 模型组, 模型+杜仲多糖低浓度组, 模型+杜仲多糖中浓度组, 模型+杜仲多糖高浓度组单因素方差分析,  $F_{P65}=0.719, F_{p-P65}=68.571, F_{P65^+}=167.970, ^bP<0.05$

Note: Compared with the blank group,  $t_{P65}=0.744, t_{p-P65}=12.481, t_{P65^+}=26.560, ^aP<0.05$ ; Model group, model+eucommia polysaccharide low concentration group, model+eucommia polysaccharide medium concentration group, model+eucommia polysaccharide high concentration group one-way analysis of variance,  $F_{P65}=0.719, F_{p-P65}=68.571, F_{P65^+}=167.970, ^bP<0.05$

损伤。

### 3.2 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞炎症反应的影响

TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  是介导骨关节炎等多种炎症疾病发生发展的炎症因子, 且 IFN- $\gamma$  可刺激细胞分泌 IL-6 等炎症因子<sup>[14]</sup>。NO 是一种不稳定的高反应性细胞毒性的自由基, 参与介导滑膜炎症形成, 可通过内质网应激引起软骨细胞凋亡<sup>[15]</sup>。ROS 具有多种的生物学活性和功能, 参与氧化应激、细胞分化及细胞凋亡等过程。本研究显示, 杜仲多糖抑制了 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞 ATDC5 培养上清中 TNF- $\alpha$ 、NO、IFN- $\gamma$  和 IL-6 的表达以及细胞内 ROS 含量, 提示杜仲多糖可降低 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞炎症反应。

### 3.3 杜仲多糖对 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞的细胞外基质的影响

炎症可诱导软骨细胞外基质降解, 破坏软骨细胞正常的结构和功能。MMP-13 是一种基质金属蛋白酶, 可特异性降解 I 型和 III 型胶原, 促进软骨细胞外基质降解<sup>[16]</sup>。TIMP-1 是基质金属蛋白酶抑制因子, 可抑制 MMP-13 等基质金属蛋白酶的活性, 保护软骨细胞<sup>[17]</sup>。研究显示, 降钙素可通过抑制 IL-1 $\beta$  诱导的人软骨细胞中 MMP-13 的表达并促进 TIMP-1 表达对软骨细胞发挥保护作用<sup>[18]</sup>, 这与本研究杜仲多糖促进了 IL-1 $\beta$  诱导的 ATDC5 细胞中 TIMP-1 蛋白表达而抑制 MMP-13 蛋白表达的结果一致, 说

明杜仲多糖也可有效降低骨关节炎软骨细胞细胞外基质降解, 降低软骨细胞损伤。

### 3.4 杜仲多糖通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路影响 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞损伤

NF- $\kappa$ B 信号通路参与调节细胞增殖、凋亡、炎症反应等生理或病理过程。正常条件下, NF- $\kappa$ B 主要以 p50 和 p65 结合构成的异二聚体形式存在于细胞质中, 并与 NF- $\kappa$ B 抑制剂 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 结合, 处于失活状态。在受到外界刺激后, I $\kappa$ B 发生磷酸化并降解, 活化后的二聚体由细胞质转移至细胞核, 进而实现转录<sup>[19]</sup>。王友庆等<sup>[20]</sup>研究显示, 槲皮素通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞中 MMP-13 的表达, 细胞基质降解及细胞凋亡, 减轻软骨细胞损伤。Bai 等<sup>[21]</sup>研究显示, L-茶氨酸通过抑制 NF- $\kappa$ B 途径减少 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞炎症细胞因子 COX-2、PGE-2、iNOS 和 NO 的表达, 并抑制了细胞外基质的降解, 其可能用于预防骨关节炎。张晓哲等<sup>[22]</sup>研究显示, 滑膜组织中 NF- $\kappa$ B P65 的表达与滑膜增生及炎症反应密切相关, 通过抑制 NF- $\kappa$ B P65 表达可减轻膝骨关节炎滑膜增生及炎症反应。本研究显示, 杜仲多糖可降低 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞 ATDC5 中 p-P65 蛋白的表达及 NF- $\kappa$ B P65 核易位, 说明其也可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路减轻 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞损伤。

综上所述, 杜仲多糖可抑制 IL-1 $\beta$  诱导的小鼠软骨细胞 ATDC5 凋亡、炎症反应和基质降解, 减轻了 ATDC5 细胞损伤, 其可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活发挥作用, 具有开发为治疗骨关节炎药物的潜在价值。

#### 参考文献

- [1] 吴锋锋, 高宏梁, 王国荣, 等. 补肾壮筋汤含药血清介导的 Sox9 基因高表达对 IL-1 $\beta$  诱导的大鼠软骨细胞损伤的保护机制研究[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(7): 96-99. WU FF, GAO HL, WANG GR, et al. Protective mechanism of bushen zhuangjin decoction containing serum on IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte injury in rats by overexpression of Sox9[J]. Yi Xue Yan Jiu Za Zhi, 2020, 49(7): 96-99. Chinese.
- [2] Han F, Jiang H, Qu W, et al. KLF11 protects chondrocytes via inhibiting p38 MAPK signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(12): 6505-6516.
- [3] Chang Q, Ji ML, Li C, et al. Downregulation of miR-486-5p alleviates LPS-induced inflammatory injury, oxidative stress and apoptosis in Chondrogenic cell ATDC5 by targeting NRF1[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3): 2123-2131.
- [4] 李晖, 骆志国. 杜仲总多糖 EOP 高调肺癌 LLC 细胞中 caspase3 表达来抑制肿瘤细胞增殖的机制研究[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(7): 1045-1048, 1060. LI H, LUO ZG. The mechanism of eucommia ulmoides total polysaccharides EOP inhibit tumor cell proliferation through upregulating Caspase3 expression in lung cancer cell line[J]. Shi Yong Ai

- Zheng Za Zhi, 2018, 33(7):1045-1048, 1060. Chinese.
- [5] 王一民,郭飞,熊勃,等.杜仲多糖改善运动疲劳的研究[J].中国应用生理学杂志,2016,32(2):57-59.  
WANG YM, GUO F, XIONG B, et al. Study of eucommialulmoides polysaccharide on improvement in exercise fatigue[J]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2016, 32(2):57-59. Chinese.
- [6] 苏卓,郭诚,梁韬.杜仲多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠的作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(14):159-162.  
SU Z, GUO C, LIANG T. Effects of eucommiae cortex polysaccharide on streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Zhongguo Shi Yan Fang Ji Xue Za Zhi, 2016, 22(14):159-162. Chinese.
- [7] Li Q, Feng YX, He W, et al. Post-screening characterisation and in vivo evaluation of an anti-inflammatory polysaccharide fraction from *Eucommia ulmoides*[J]. Carbohydr Polym, 2017, 169(2):304-314.
- [8] 郭晓臣,欧阳辉,张近宝,等.杜仲多糖对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].药物评价研究,2014,37(1):34-36.  
WU XC, OUYANG H, ZHANG JB, et al. Preservation of *Eucommia ulmoides* polysaccharides on rabbit with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Yao Wu Ping Jia Yan Jiu, 2014, 37(1):34-36. Chinese.
- [9] Fan ZY, Liu YH, Shi ZL, et al. MiR-155 promotes interleukin-1 $\beta$ -induced chondrocyte apoptosis and catabolic activity by targeting PIK3R1-mediated PI3K/Akt pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(15):8441-8451.
- [10] 付长龙,潘彩彬,刘国强,等.药对巴戟天-杜仲总多糖的含量测定及其对大鼠软骨细胞增殖的影响[J].风湿病与关节炎,2014,3(6):23-26.  
FU CL, PAN CB, LIU GQ, et al. Assaying polysaccharide in couplet drugs of bajitian (*radix morindae officinalis*) and Duzhong (*cortex eucommiae*) and its effects on the proliferation of rat chondrocytes[J]. Feng Shi Bing Yu Guan Jie Yan, 2014, 3(6):23-26. Chinese.
- [11] 王乾宇,王文佳,奚锦,等.杜仲多糖对肝纤维化模型大鼠 I, III 型胶原蛋白, MMP-1, TIMP-1 及 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(23):153-158.  
WANG QY, WANG WJ, XI J, et al. Effect of polysaccharides from eucommiae cortex on expressions of genes of I, III collagen, MMP-1, TIMP-1 and TGF- $\beta$ 1 from hepatic fibrosis in rat models[J]. Zhongguo Shi Yan Fang Ji Xue Za Zhi, 2018, 24(23):153-158. Chinese.
- [12] 江增宏,徐飞飞,周民举.杜仲多糖对慢性吗啡耐受小鼠的影响及机制研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2019,40(17):2121-2123.  
JIANG ZH, XU FF, ZHOU MJ. The effect of *Eucommia ulmoides* Oliv polysaccharid on chronic morphine tolerance in mice and its mechanism[J]. Qi Qi Ha Er Yi Xue Yuan Xue Bao, 2019, 40(17):2121-2123. Chinese.
- [13] 江增宏,周民举.杜仲多糖对神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用[J].赣南医学院学报,2019,39(2):114-117.  
JIANG ZH, ZHOU MJ. The analgesic effect of EOP on rats of neuropathic pain[J]. Gan Nan Yi Xue Yuan Xue Bao, 2019, 39(2):114-117. Chinese.
- [14] Qiao ZG, Tang JX, Wu W, et al. Acteoside inhibits inflammatory response via JAK/STAT signaling pathway in osteoarthritic rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1):264-284.
- [15] 王灿键.中药秦艽汤对膝关节骨性关节炎患者临床疗效及血清 SOD、NO 及 MDA 表达的影响[J].中医临床研究,2020,12(12):67-69.  
WANG CJ. Effect of Qinjiao Decoction on clinical efficacy and expression of serum SOD, NO and MDA in patients with knee osteoarthritis[J]. Zhong Yi Lin Chuang Yan Jiu, 2020, 12(12):67-69. Chinese.
- [16] Yang YR, Yang XF, Duan HC, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib prevents chondrocytes against hypertrophy via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(3):785-794.
- [17] Hu PF, Sun FF, Jiang LF, et al. Paeoniflorin inhibits IL-1 $\beta$ -induced MMP secretion via the NF- $\kappa$ B pathway in chondrocytes[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(2):1513-1519.
- [18] Bai XD, Guo A, Li YD. Protective effects of calcitonin on IL-1 stimulated chondrocytes by regulating MMPs/TIMP-1 ratio via suppression of p50-NF- $\kappa$ B pathway[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(4):598-604.
- [19] Ma YQ, Song XP, Ma TW, et al. Aminoguanidine inhibits IL-1 $\beta$ -induced protein expression of iNOS and COX-2 by blocking the NF- $\kappa$ B signaling pathway in rat articular chondrocytes[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3):2623-2630.
- [20] 王友庆,陈士芳,梅珏.槲皮素通过抑制 NF- $\kappa$ B 减弱类风湿关节炎大鼠软骨细胞基质降解和细胞凋亡[J].免疫学杂志,2019,35(6):485-491.  
WANG YQ, CHEN SF, MEI J. Quercetin attenuates chondrocytes matrix degradation and apoptosis in rheumatoid arthritis rats by inhibiting NF- $\kappa$ B[J]. Mian Yi Xue Za Zhi, 2019, 35(6):485-491. Chinese.
- [21] Bai H, Zhang ZH, Li Y, et al. L-theanine reduced the development of knee osteoarthritis in rats via its anti-inflammation and anti-matrix degradation actions; in vivo and in vitro study[J]. Nutrients, 2020, 12(7):1988-2017.
- [22] 张晓哲,张栋,阮安民,等.通络止痛凝胶剂对 KOA 滑膜组织中 p53/miR-502-5p/NF- $\kappa$ Bp65 的影响[J].中国骨伤,2020,33(7):643-648.  
ZHANG XZ, ZHANG D, RUAN AM, et al. Effect of Tongluo Zhi-tong(通络止痛, TLZT) gel preparation on p53/miR-502-5p/NF- $\kappa$ Bp65 in synovial tissue of knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Traumat, 2020, 33(7):643-648. Chinese with abstract in English.

(收稿日期:2020-05-19 本文编辑:王玉蔓)