

基于 NF- κ B 信号通路探讨独活寄生汤抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制

许丽梅¹, 李慧², 许云腾¹, 王圣杰², 曾建伟¹, 王丽丽¹, 叶蕪芝³, 李西海¹

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122;

3. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122)

摘要 目的:基于 NF- κ B 信号通路探讨独活寄生汤抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制。**方法:**取 4 周龄 SPF 级 SD 大鼠双侧膝关节软骨, 分离软骨细胞进行体外培养。取培养的第 2 代软骨细胞, 随机分为 5 组。空白组中加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 模型组加入含 10 ng · mL⁻¹ 脂多糖的 10% FBS DMEM 培养基, 独活寄生汤低、中、高浓度组加入含脂多糖 (10 ng · mL⁻¹) 和独活寄生汤 (浓度分别为 100 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹、300 μ g · mL⁻¹) 的 10% FBS DMEM 培养基。干预 8 h 后, 采用 ELISA 法测定各组细胞培养液上清液中的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) -9 含量, 确定独活寄生汤最佳干预浓度。随后取培养的第 2 代软骨细胞, 随机分为 4 组。空白组不进行干预, 模型组加入 10 ng · mL⁻¹ 脂多糖, 独活寄生汤组加入 10 ng · mL⁻¹ 脂多糖和最佳浓度的独活寄生汤, 抑制剂组加入 10 ng · mL⁻¹ 脂多糖和 10 μ mol 吡咯烷二硫代甲酸铵盐。干预 8 h 后, 采用荧光定量 PCR 法检测软骨细胞中 NF- κ B 基因含量、用免疫荧光检测法观察软骨细胞中 NF- κ B 蛋白核转位情况。**结果:**①独活寄生汤最佳干预浓度测定结果。空白组、模型组、独活寄生汤低浓度组、独活寄生汤中浓度组、独活寄生汤高浓度组的 MMP-9 含量比较, 差异有统计学意义 [(0.125 ± 0.012) ng · mL⁻¹, (0.154 ± 0.008) ng · mL⁻¹, (0.148 ± 0.012) ng · mL⁻¹, (0.148 ± 0.010) ng · mL⁻¹, (0.134 ± 0.002) ng · mL⁻¹, $\chi^2 = 10.034$, $P = 0.040$]。模型组的 MMP-9 含量高于空白组和独活寄生汤高浓度组 ($P = 0.002$, $P = 0.006$); 空白组与独活寄生汤高浓度组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.573$); 独活寄生汤低、中浓度组 MMP-9 含量与模型组比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.483$, $P = 0.356$)。上述测定结果显示独活寄生汤最佳干预浓度为 300 μ g · mL⁻¹。②软骨细胞中 NF- κ B 基因含量。空白组、模型组、独活寄生汤组、抑制剂组的 NF- κ B 基因含量比较, 差异有统计学意义 [1.013 ± 0.015, 1.848 ± 0.216, 1.454 ± 0.250, 1.289 ± 0.332, $F = 8.859$, $P = 0.002$]。模型组的 NF- κ B 基因含量高于空白组、独活寄生汤组和抑制剂组 ($P = 0.000$, $P = 0.035$, $P = 0.006$); 独活寄生汤组的 NF- κ B 基因含量高于空白组 ($P = 0.021$); 独活寄生汤组的 NF- κ B 基因含量与抑制剂组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.341$)。③软骨细胞中 NF- κ B 蛋白核转位情况。各组软骨细胞核均呈蓝色; 软骨细胞 NF- κ B 蛋白染色明显, 呈绿色; 模型组 NF- κ B 蛋白核转位最为明显, 空白组、抑制剂组 NF- κ B 蛋白核转位相对较少, 独活寄生汤组 NF- κ B 蛋白核转位情况介于空白组与模型组之间。**结论:**独活寄生汤可通过抑制 NF- κ B 蛋白核转位, 减轻脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应, 从而延缓软骨退变。

关键词 骨关节炎; 软骨细胞; 独活寄生汤; 炎症反应; 脂多糖类; NF- κ B

An experimental study of mechanism of action of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤) in inhibiting inflammatory reaction induced by lipopolysaccharide in chondrocytes based on NF- κ B signaling pathway

XU Limei¹, LI Hui², XU Yunteng¹, WANG Shengjie², ZENG Jianwei¹, WANG Lili¹, YE Hongzhi³, LI Xihai¹

1. Academy of Integrated Medicine affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

2. Pharmaceutical college of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

3. Fujian Key Laboratory of Integrated Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of action of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤, DHJST) in inhibiting inflammatory

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573998); 中国博士后科学基金第 60 批面上资助项目 (2016M600625); 中国博士后科学基金第 10 批特别资助项目 (2017T100591)

通讯作者: 李西海 E-mail: lixihai79dahai@163.com

reaction induced by lipopolysaccharide(LPS)in chondrocytes based on NF- κ B signaling pathway. **Methods:** The 4-week-old SPF-grade SD rats were executed and their articular cartilages were fetched out from both knees, and the chondrocytes were extracted from the knee cartilage tissues and were cultured in vitro. The second-generation chondrocytes were divided into 5 groups, and were cultured in DMEM added with 10% FBS (blank group), 10% FBS and LPS (10 ng/mL) (model group), 10% FBS, LPS (10 ng/mL) and DHJST (100 μ g/mL) (DHJST low-concentration group), 10% FBS, LPS (10 ng/mL) and DHJST (200 μ g/mL) (DHJST middle-concentration group) and 10% FBS, LPS (10 ng/mL) and DHJST (300 μ g/mL) (DHJST high-concentration group) respectively. The content of matrix metalloproteinase (MMP)-9 in supernatant of cell culture fluid of each group were measured by using ELISA method after 8-hour intervention to determine the optimal intervention concentration of DHJST. Then the second-generation chondrocytes were randomly divided into blank group, model group, DHJST group and inhibitor group. The chondrocytes in blank group were not intervened and the chondrocytes in the other three groups were cultured in DMEM added with LPS (10 ng/mL), DMEM added with LPS (10 ng/mL) and DHJST with optimal concentration and DMEM added with LPS (10 ng/mL) and PDTC (10 μ mol) respectively. After 8-hour intervention, the gene content of NF- κ B in chondrocytes were detected by using fluorescent quantitative PCR method, and nuclear translocation of NF- κ B protein in chondrocytes were detected by using immunofluorescence assay. **Results:** There was statistical difference in content of MMP-9 between blank group, model group, DHJST low-, middle- and high-concentration group (0.125 \pm 0.012, 0.154 \pm 0.008, 0.148 \pm 0.012, 0.148 \pm 0.010, 0.134 \pm 0.002 ng/mL, $\chi^2 = 10.034$, $P = 0.040$). The content of MMP-9 was higher in model group compared to blank group and DHJST high-concentration group ($P = 0.002$, $P = 0.006$), and there was no statistical difference in content of MMP-9 between blank group and DHJST high-concentration group ($P = 0.573$). There was no statistical difference in content of MMP-9 between DHJST low-concentration group and model group and between DHJST middle-concentration group and model group ($P = 0.483$, $P = 0.356$). Above results showed that the optimal intervention concentration of DHJST was 300 μ g/mL. There was statistical difference in gene content of NF- κ B between blank group, model group, DHJST group and inhibitor group (1.013 \pm 0.015, 1.848 \pm 0.216, 1.454 \pm 0.250, 1.289 \pm 0.332, $F = 8.859$, $P = 0.002$). The gene content of NF- κ B was higher in model group compared to blank group, DHJST group and inhibitor group, and was higher in DHJST group compared to blank group ($P = 0.000$, $P = 0.035$, $P = 0.006$; $P = 0.021$). There was no statistical difference in gene content of NF- κ B between DHJST group and inhibitor group ($P = 0.341$). The cytoplasm of chondrocytes presented with blue staining in each group. The chondrocytes presented with obvious green staining of NF- κ B protein. The most obvious nuclear translocations of NF- κ B protein were found in model group, and relatively less nuclear translocations of NF- κ B protein were found in blank group and inhibitor group, and the nuclear translocation of NF- κ B protein in DHJST group was between blank group and model group. **Conclusion:** DHJST can alleviate inflammatory reaction induced by LPS in chondrocytes through inhibiting nuclear translocation of NF- κ B protein, which may be the mechanisms of action for delaying articular cartilage degeneration.

Keywords osteoarthritis; chondrocytes; Duhuo Jisheng Tang; inflammatory response; lipopolysaccharides; NF- κ B

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨变性破坏、软骨下骨重塑、骨赘形成、关节腔内炎症反应为主要病理表现的慢性进展性疾病, 其致病因素尚不明确, 主要与遗传、生物力学、生物学等多种因素有关^[1], 其中炎症反应在 OA 发生发展过程中起着至关重要的作用^[2-3]。独活寄生汤作为临床治疗 OA 的经典方剂, 已被证实能有效减缓关节软骨退变^[4-6], 但其相关作用机制尚未完全阐明。NF- κ B 信号通路参与并调控软骨细胞的增殖、分化、凋亡, 在 OA 的发生、发展过程中扮演着重要的角色^[7-8]。本研究基于 NF- κ B 信号通路探讨了独活寄生汤抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制, 以期独活寄生汤治疗 OA 提供相关理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量

200 ~ 250 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2012-0002。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 独活寄生汤, 药物组成包括独活 9 g、细辛 3 g、茯苓 6 g、桑寄生 6 g、肉桂 6 g、防风 6 g、川芎 6 g、当归 6 g、牛膝 6 g、秦艽 6 g、人参 6 g、白芍 6 g、熟地黄 6 g、杜仲 6 g、甘草片 6 g, 高温煎煮浓缩后低温储存备用; 脂多糖 (Sigma 公司); 吡咯烷二硫代甲酸铵盐 (pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 9 ELISA 试剂盒 (R&D Systems 公司); NF- κ B 抗体 (Abcam 公司); GOXR B ALEXA FLUOR 488, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (Thermo 公司); 反转录试剂盒 (Takara 公司); AceQ qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒 (南京诺唯赞

生物科技有限公司); DAB 显色试剂盒、免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); Trizol (Life 公司)。

1.3 实验仪器 UltraView VoX 双转盘活细胞共聚焦实时成像系统(PerkinElmer 公司); NANODROP 2000C RNA 浓度测定仪、Multiskan FC 酶标仪(Thermo 公司); DM4000B 光学显微镜(LEICA 公司); 7500FAST 荧光定量 PCR 仪(Applied Bio Systems 公司)。

2 方 法

2.1 软骨细胞分离与培养 以 10% 水合氯醛将大鼠麻醉后处死,取双侧膝关节,无菌条件下用手术刀片取关节表面软骨组织,置于培养皿中。用 PBS 漂洗 3 次后,用手术刀片切碎,加入 0.2% II 型胶原酶 4 mL,于 37 ℃ 的培养箱中消化 2 h,将获得的细胞培养于含 10% FBS 的培养液中。未消化完全的组织块中加入新 0.2% II 型胶原酶 4 mL,重复上述步骤 3 次。每隔 2 d 换液 1 次,倒置相差显微镜下观察软骨细胞状态并记录,待软骨细胞占满培养瓶底部约 80% 后,进行传代。

2.2 软骨细胞鉴定 取第 2 代软骨细胞,接种于爬片上,10% FBS 培养 2 d 后,用 PBS 洗 3 次,用 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定 30 min, PBS 清洗后用 0.5% Triton - 100 室温处理 15 min。按照免疫组化试剂盒说明书进行处理,阳性组使用 II 型胶原抗体孵育、阴性组用一抗稀释液代替,4 ℃ 过夜,取出后用 PBS 洗 3 次,二抗室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, DAB 显色液显色 15 min, 纯水漂洗,晾干,中性树脂封片,光学显微镜观察并拍照。

2.3 独活寄生汤最佳干预浓度测定 将第 2 代软骨细胞以同等比例均匀接种于 6 孔板中,10% FBS 培养 2 d 后,随机分为空白组、模型组、独活寄生汤低浓度组、独活寄生汤中浓度组、独活寄生汤高浓度组。根据前期实验结果,确定脂多糖诱导软骨细胞炎症模型浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[9]。空白组中加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,模型组加入含 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖的 10% FBS DMEM 培养基,独活寄生汤低、中、高浓度组加入含脂多糖($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)和独活寄生汤(浓度分别为 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $300 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 10% FBS DMEM 培养基。干预 8 h 后收集细胞培养液,室温下以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min(离心半径

8.4 cm),吸取上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书处理细胞上清液样品,用多功能酶标仪在 450 nm 波长检测 OD 值,根据公式计算样品中 MMP - 9 含量。

2.4 软骨细胞中 NF - κ B 基因含量测定 第 2 代软骨细胞按照相同比例均匀接种于 6 孔板中,待细胞培养至铺满瓶底 80% 后随机分为 4 组。空白组不进行干预,模型组加入 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖,独活寄生汤组加入 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖和最佳浓度(上一步实验确定)的独活寄生汤,抑制剂组加入 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖和 $10 \text{ } \mu\text{mol}$ PDTC。干预 8 h 后, PBS 洗 2 次,每孔加入 1 mL Trizol 试剂收集样本,提取各组总 RNA 后,进行逆转录。再取 2 μL 逆转录产物,根据 AceQ qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒说明书操作,采用荧光定量 PCR 仪进行荧光测定,相关引物序列如下: NF - κ B 上游 AGAGAAGCACAGATACCACTAAGA, 下游 GTTCAGCCTCATAGAAGCCATC; GAPDH 上游 ACGGCAAGTTCAACGGCAG, 下游 GAAGACGC-CAGTAGA CTCCACGAC。

2.5 软骨细胞中 NF - κ B 蛋白核转位情况观察 细胞分组、干预方法同 NF - κ B 基因含量测定。各组干预 8 h 后,弃去培养液, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定 30 min, PBS 清洗。加 0.5% Triton - 100 在 37 ℃ 处理 15 min, 山羊血清室温封闭 60 min, PBS 清洗, NF - κ B 一抗 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗 5 次。荧光二抗室温孵育 1 h, DAPI 染色 5 min, PBS 洗 5 次。荧光显微镜下观察,拍照保存。

2.6 数据统计 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。各组软骨细胞培养液中 MMP - 9 含量的总体比较采用多样本秩和检验,各组软骨细胞中 NF - κ B 基因表达量的总体比较采用方差分析,组间两两比较均采用 LSD - t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

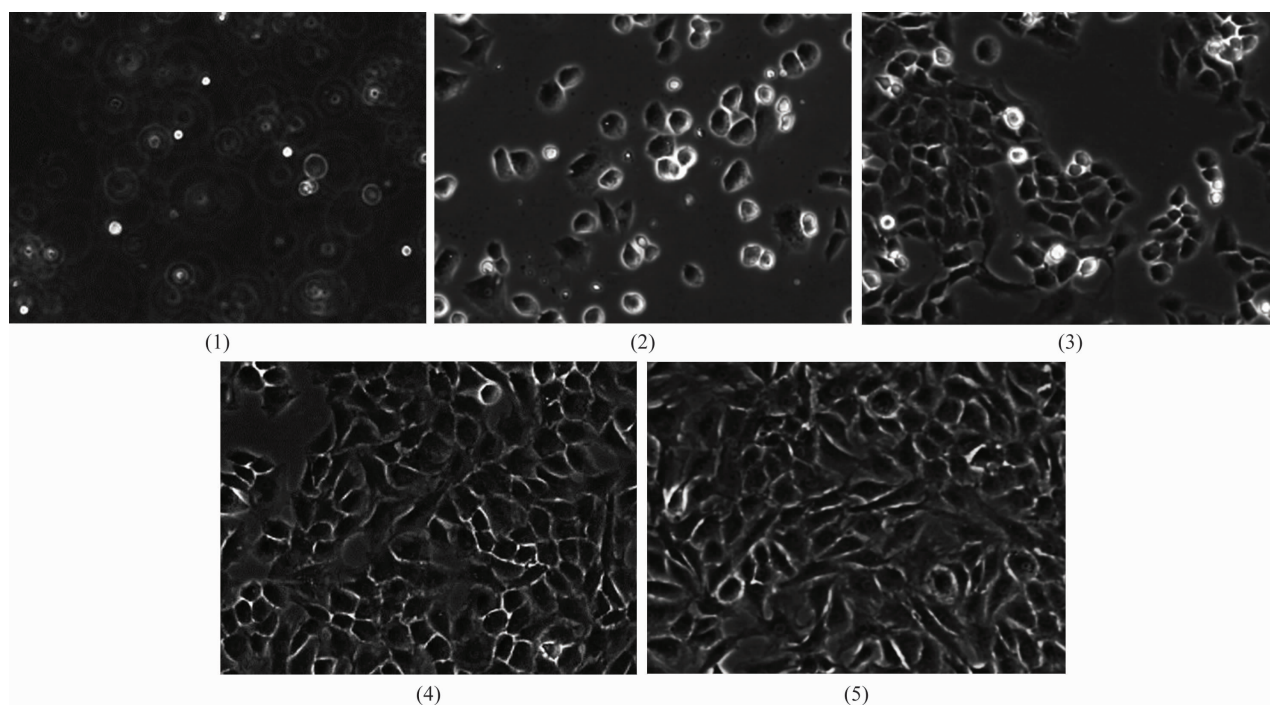
3.1 软骨细胞形态观察结果 从倒置相差显微镜下可以观察到,刚收集的原代软骨细胞悬浮于培养液中,略小而圆[图 1(1)];培养 2 d 后,细胞逐渐贴壁,体积变大,开始伸展呈圆形或椭圆形[图 1(2)];第 5 天后细胞继续生长,并成簇样生长,开始融合[图 1(3)]。第 1 代细胞培养 2 d 后呈梭形或椭圆形,并呈“铺路石样”聚集[图 1(4)];第 2 代软骨细胞增殖速度较快,形态结构一致,呈梭形或多边形,胞浆丰富,胞核清晰,可见 1 ~ 2 个核仁,逐渐融合为单层[图 1(5)]。

3.2 软骨细胞鉴定结果 阳性组的软骨细胞胞浆被染为棕黄色,核为蓝紫色,具有软骨细胞的典型特征;阴性组胞浆不着色(图 2)。

3.3 独活寄生汤最佳干预浓度测定结果 空白组、模型组、独活寄生汤低浓度组、独活寄生汤中浓度组、独活寄生汤高浓度组的 MMP-9 含量比较,差异有统计学意义 $[(0.125 \pm 0.012) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}, (0.154 \pm 0.008) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}, (0.148 \pm 0.012) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}, (0.148 \pm 0.010) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}, (0.134 \pm 0.002) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}, \chi^2 = 10.034, P = 0.040]$ 。模型组的 MMP-9 含量高于空白组和独活寄生汤高浓度组($P = 0.002, P = 0.006$);空白组与独活寄生汤高浓度组比较,差异无统计学意

义($P = 0.573$);独活寄生汤低、中浓度组 MMP-9 含量与模型组比较,差异均无统计学意义($P = 0.483, P = 0.356$)。上述测定结果显示独活寄生汤最佳干预浓度为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 软骨细胞中 NF- κ B 基因含量 空白组、模型组、独活寄生汤组、抑制剂组的 NF- κ B 基因含量比较,差异有统计学意义 $[1.013 \pm 0.015, 1.848 \pm 0.216, 1.454 \pm 0.250, 1.289 \pm 0.332, F = 8.859, P = 0.002]$ 。模型组的 NF- κ B 基因含量高于空白组、独活寄生汤组和抑制剂组($P = 0.000, P = 0.035, P = 0.006$);独活寄生汤组的 NF- κ B 基因含量高于空白组($P = 0.021$);独活寄生汤组的 NF- κ B 基因



(1)原代软骨细胞培养第 1 天;(2)原代软骨细胞培养第 3 天;(3)原代软骨细胞培养第 5 天;(4)第 1 代软骨细胞培养第 2 天;(5)第 2 代软骨细胞培养第 2 天

图 1 软骨细胞形态观察结果($\times 200$)

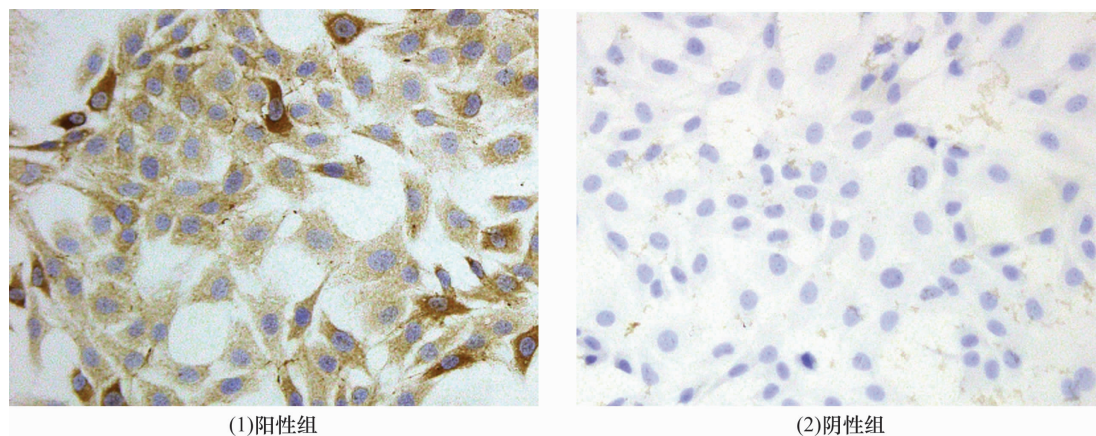


图 2 第 2 代软骨细胞 II 型胶原免疫组化染色结果($\times 100$)

含量与抑制剂组比较,差异无统计学意义($P = 0.341$)。

3.5 软骨细胞中 NF- κ B 蛋白核转位情况 各组软骨细胞核均呈蓝色;软骨细胞 NF- κ B 蛋白染色明显,呈绿色;模型组 NF- κ B 蛋白核转位最为明显,空白组、抑制剂组 NF- κ B 蛋白核转位相对较少,独活寄生汤组 NF- κ B 蛋白核转位情况介于空白组与模型组之间(图 3)。

4 讨 论

OA 是一种中老年人常见的慢性、退行性骨关节

疾病,以软骨破坏、骨赘形成为主要病理特征,属中医学“痹证”“痿证”范畴,其特点为本虚标实、本痿标痹^[10]。独活寄生汤出自《备急千金要方》,具有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血的功效,是临床治疗 OA 的常用方之一^[11]。软骨细胞作为软骨中的唯一细胞,对于细胞外基质结构、功能的维持及关节软骨的稳态十分重要^[12]。故本实验选择软骨细胞作为实验对象,采用机械和酶消化结合的方法取得了较高纯度的软骨细胞。

目前的研究表明,关节软骨中 MMPs 的增加是导

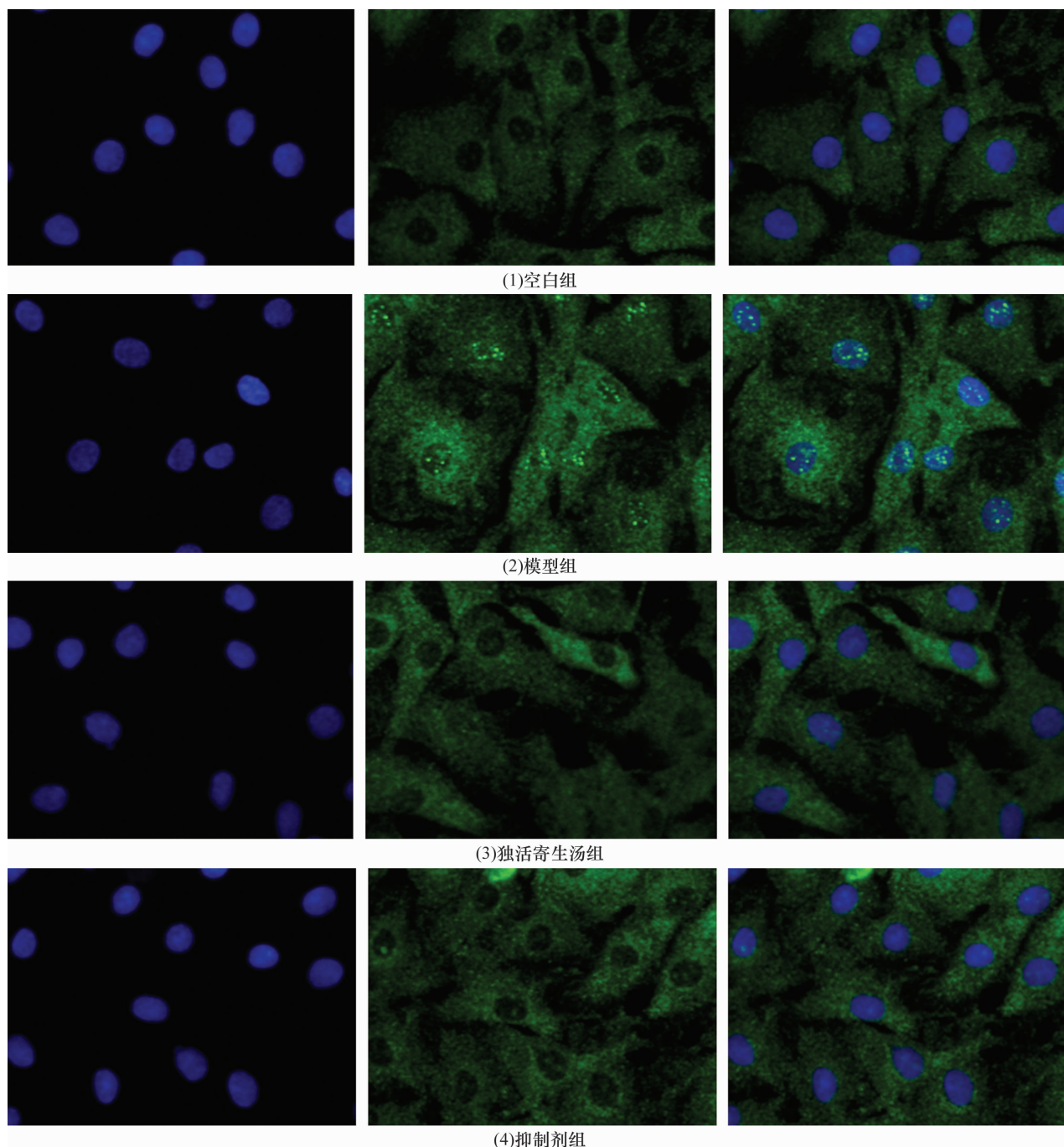


图 3 各组大鼠软骨细胞免疫荧光染色结果($\times 200$)

致软骨细胞外基质降解,引起软骨退化的重要原因^[13-14]。在 MMPs 家族中,MMP-9 的作用主要是暴露胶原、破坏软骨基质、破坏胶原形成的网状结构^[15]。脂多糖又称内毒素,可以通过激活 Toll 样受体 4,进而引发一系列信号级联反应,最终激活 NF- κ B,从而启动一系列免疫相关基因^[16-17],引起大量炎性细胞浸润,诱发或加重炎症反应^[18]。因此本实验选用脂多糖诱导建立体外软骨细胞炎症模型,以 MMP-9 作为检测指标,确定独活寄生汤干预的最佳浓度为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

NF- κ B 在 OA 炎症反应及疾病的发生发展过程中具有至关重要的作用^[19-20]。NF- κ B 信号通路被激活时能够增强炎症细胞因子白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 的表达,促进 MMPs 的生成^[21-23],最终导致软骨降解和关节损伤,加速 OA 进程。因此,抑制 NF- κ B 蛋白核转位可能是治疗 OA 的潜在作用途径。

本研究的结果提示,独活寄生汤可通过抑制 NF- κ B 蛋白核转位,减轻脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应,从而延缓软骨退变。但是由于引起 OA 的因素众多,加之独活寄生汤成分复杂,具体机制还有待于进一步研究证实。

5 参考文献

- [1] CORR E M, CUNNINGHAM C C, HELBERT L, et al. Osteoarthritis - associated basic Calcium phosphate crystals activate membrane proximal kinases in human innate immune cells[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 23.
- [2] SCANZELLO C R. Role of low - grade inflammation in osteoarthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2017, 29(1): 79 - 85.
- [3] SHEN J, ABU - AMER Y, O'KEEFE R J, et al. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis[J]. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(1): 49 - 63.
- [4] 周江涛, 赵依娜, 王庆来. 独活寄生汤口服联合玻璃酸钠关节腔注射治疗早中期膝骨关节炎[J]. *中医正骨*, 2019, 31(2): 17 - 21.
- [5] 何晓娟, 林平冬, 马玉环, 等. 独活寄生汤含药血清抑制白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制研究[J]. *中医正骨*, 2017, 29(8): 1 - 7.
- [6] 郑文伟, 翁霞萍, 黄绥心, 等. 独活寄生汤对骨关节炎软骨退变的影响及其作用机制[J]. *中医正骨*, 2017, 29(7): 5 - 11.
- [7] OLIVOTTO E, OTERO M, MARCU K B, et al. Pathophysiology of osteoarthritis: canonical NF - kappaB/IKKbeta - dependent and kinase - independent effects of IKKalpha in cartilage degradation and chondrocyte differentiation[J]. *RMD Open*, 2015, 1(Suppl 1): e 000061.
- [8] ZHONG J H, LI J, LIU C F, et al. Effects of microRNA - 146a on the proliferation and apoptosis of human osteoarthritis chondrocytes by targeting TRAF6 through the NF - kappa B signalling pathway[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(2) [2019 - 04 - 01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408711>.
- [9] 陈后煌, 邵翔, 叶蕪芝, 等. 独活寄生汤对脂多糖诱导的大鼠软骨细胞炎症模型 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响[J]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2017, 3(2): 77 - 84.
- [10] 李西海, 刘献祥. 骨关节炎的核心病机——本痿标痹[J]. *中医杂志*, 2014, 55(14): 1248 - 1249.
- [11] 李西海, 梁文娜, 叶蕪芝, 等. 独活寄生汤调控风寒湿痹型骨关节炎软骨下骨重建失衡的作用机制探讨[J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(8): 62 - 64.
- [12] HWANG H S, KIM H A. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26035 - 26054.
- [13] RAHMATI M, NALESSO G, MOBASHERI A, et al. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 40: 20 - 30.
- [14] CUI N, HU M, KHALIL R A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 1 - 73.
- [15] ZENG G Q, CHEN A B, LI W, et al. High MMP - 1, MMP - 2, and MMP - 9 protein levels in osteoarthritis[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 14811 - 14822.
- [16] SESTITO S E, FACCHINI F A, MORBIOLI I A, et al. Amphiphilic guanidinocalixarenes inhibit lipopolysaccharide (LPS) - and Lectin - Stimulated toll - like receptor 4 (TLR4) signaling[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(12): 4882 - 4892.
- [17] LU Y C, YE H W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145 - 151.
- [18] ROY A, SRIVASTAVA M, SAQIB U, et al. Potential therapeutic targets for inflammation in toll - like receptor 4 (TLR4) - mediated signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 79 - 89.
- [19] LEPETSOS P, PAPAVALASSILOU K A, PAPAVALASSILOU A G. Redox and NF - kappa B signaling in osteoarthritis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132: 90 - 100.
- [20] SAITO T, TANAKA S. Molecular mechanisms underlying osteoarthritis development: Notch and NF - kB[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 94.

(下转第 20 页)