

蒺藜皂苷对白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和炎症因子分泌的影响

于兰, 解冬千, 王霞, 及超

(保定市第二医院, 河北 保定 071001)

摘要 **目的:**观察蒺藜皂苷对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导的软骨细胞凋亡和炎症因子分泌的影响,并探讨其作用机制。**方法:**①软骨细胞培养和转染。采用 DMEM 培养液培养小鼠软骨细胞(ATDC5 细胞),培养后采用转染试剂分别转染 pcDNA-circ_0045714、pcDNA、si-circ_0045714、si-NC。②蒺藜皂苷浓度筛选。将 ATDC5 细胞接种于 96 孔板中,一组正常培养(正常组),一组加入 10 ng · mL⁻¹ 的 IL-1 β (IL-1 β 组),其他组在加入 10 ng · mL⁻¹ IL-1 β 的基础上分别加入浓度为 25 μ g · mL⁻¹、50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹、400 μ g · mL⁻¹ 的蒺藜皂苷。培养后计算软骨细胞存活率,并确定后续实验蒺藜皂苷的浓度。③软骨细胞增殖抑制率检测。将 ATDC5 细胞分为对照组、IL-1 β 组、IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组,其中对照组采用常规培养液培养,IL-1 β 组采用含 10 ng · mL⁻¹ 的 IL-1 β 培养液培养,IL-1 β + 蒺藜皂苷低、中、高剂量组分别采用含 50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹ 的蒺藜皂苷和 10 ng · mL⁻¹ 的 IL-1 β 培养液培养。转染 pcDNA-circ_0045714、pcDNA 的 ATDC5 细胞,培养方法同 IL-1 β 组,并分别标记为 IL-1 β + pcDNA-circ_0045714 组、IL-1 β + pcDNA 组。转染 si-circ_0045714、si-NC 的 ATDC5 细胞,培养方法同 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组,并分别标记为 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-circ_0045714 组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-NC 组。培养后计算软骨细胞增殖抑制率。④软骨细胞凋亡率检测。于 6 孔板中接种 ATDC5 细胞及转染 pcDNA-circ_0045714、pcDNA、si-circ_0045714、si-NC 的 ATDC5 细胞,培养后采用流式细胞仪检测各组软骨细胞凋亡率。⑤软骨细胞中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)含量检测。收集各组软骨细胞的培养液,检测上清液中 TNF- α 和 IL-6 含量。⑥软骨细胞中 circ_0045714 表达量检测。提取各组软骨细胞中总 RNA,逆转录合成 cDNA,然后扩增,最后计算 circ_0045714 的表达量。**结果:**①蒺藜皂苷浓度筛选结果。IL-1 β 组的软骨细胞存活率低于正常组(LSD- t = 15.396, P = 0.000)。IL-1 β 组与 IL-1 β + 25 μ g · mL⁻¹ 蒺藜皂苷组的软骨细胞存活率比较,差异无统计学意义(LSD- t = 1.555, P = 0.918)。IL-1 β + 50 μ g · mL⁻¹ 蒺藜皂苷组、IL-1 β + 100 μ g · mL⁻¹ 蒺藜皂苷组、IL-1 β + 200 μ g · mL⁻¹ 蒺藜皂苷组、IL-1 β + 400 μ g · mL⁻¹ 蒺藜皂苷组的软骨细胞存活率均高于 IL-1 β 组(LSD- t = 4.879, P = 0.047; LSD- t = 7.686, P = 0.001; LSD- t = 10.657, P = 0.000; LSD- t = 10.073, P = 0.000)。IL-1 β + 400 μ g · mL⁻¹ 蒺藜皂苷组与 IL-1 β + 200 μ g · mL⁻¹ 蒺藜皂苷组的软骨细胞存活率比较,差异无统计学意义(LSD- t = 0.584, P = 0.999)。因此,选择浓度为 50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹ 的蒺藜皂苷进行实验,并分别标记为蒺藜皂苷低剂量组、中剂量组、高剂量组。②软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量检测结果。IL-1 β 组的软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量均高于对照组、IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组(软骨细胞增殖抑制率: LSD- t = 55.829, P = 0.000; LSD- t = 8.879, P = 0.001; LSD- t = 20.507, P = 0.000; LSD- t = 30.315, P = 0.000; 软骨细胞凋亡率: LSD- t = 27.508, P = 0.000; LSD- t = 5.076, P = 0.032; LSD- t = 11.689, P = 0.000; LSD- t = 21.284, P = 0.000; 软骨细胞中 TNF- α 含量: LSD- t = 29.990, P = 0.000; LSD- t = 7.720, P = 0.002; LSD- t = 17.182, P = 0.000; LSD- t = 24.615, P = 0.000; 软骨细胞中 IL-6 含量: LSD- t = 33.441, P = 0.000; LSD- t = 6.324, P = 0.008; LSD- t = 15.440, P = 0.000; LSD- t = 25.096, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组的软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量均高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组(软骨细胞增殖抑制率: (LSD- t = 11.627, P = 0.000; LSD- t = 21.436, P = 0.000; 软骨细胞凋亡率: LSD- t = 6.613, P = 0.006; LSD- t = 16.209, P = 0.000; 软骨细胞中 TNF- α 含量: LSD- t = 9.463, P = 0.000; LSD- t = 16.895, P = 0.000; 软骨细胞中 IL-6 含量: LSD- t = 9.117, P = 0.001; LSD- t = 18.773, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组的软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量均高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组(LSD- t = 9.808, P = 0.000; LSD- t = 9.595, P = 0.000; LSD- t = 7.432, P = 0.003; LSD- t = 9.656, P = 0.000)。③软骨细胞中 circ_0045714 表达量检测结果。IL-1 β 组软骨细胞中 circ_0045714 表达量低于对照组、IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组(LSD- t = 43.218, P = 0.000; LSD- t = 9.487, P = 0.000; LSD- t = 22.136, P = 0.000; LSD- t = 34.785, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组软骨细胞

中 circ_0045714 表达量低于 IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 12.649, P = 0.000; LSD- t = 25.298, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组软骨细胞中 circ_0045714 表达量低于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 12.649, P = 0.000)。④过表达和干扰 circ_0045714 的软骨细胞构建结果。转染 pcDNA、pcDNA-circ_0045714 的软骨细胞中 circ_0045714 表达量比较,差异有统计学意义 (1.00 ± 0.00 , 4.18 ± 0.14 , t = 39.342, P = 0.000),说明过表达 circ_0045714 的软骨细胞构建成功。转染 si-NC、si-circ_0045714 的软骨细胞中 circ_0045714 表达量比较,差异有统计学意义 (1.00 ± 0.00 , 0.28 ± 0.04 , t = 31.177, P = 0.000),说明干扰 circ_0045714 的软骨细胞构建成功。⑤过表达 circ_0045714 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞影响结果。IL-1 β + pcDNA-circ_0045714 组的软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量均低于 IL-1 β + pcDNA 组 (t = 16.290, P = 0.000; t = 11.359, P = 0.000; t = 11.988, P = 0.000; t = 12.266, P = 0.000)。⑥干扰 circ_0045714 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞影响结果。IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-circ_0045714 组软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量均高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-NC 组 (t = 9.586, P = 0.001; t = 9.120, P = 0.001; t = 7.069, P = 0.002; t = 10.548, P = 0.001)。结论:蒺藜皂苷能抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及炎症因子表达,具有治疗骨关节炎的潜在价值,其作用机制可能与上调软骨细胞中 circ_0045714 表达有关,且 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷的效果更佳。

关键词 骨关节炎;软骨细胞;细胞凋亡;蒺藜;皂苷类;白细胞介素-1 β ;RNA,环状;炎症介导素类

Effects of tribulus terrestris saponins on interleukin-1 β -induced chondrocyte apoptosis and inflammatory factor secretion

YU Lan, XIE Dongqian, WANG Xia, JI Chao

The No. 2 Hospital of Baoding, Baoding 071001, Hebei, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the effects of tribulus terrestris saponins (TTS) on interleukin-1 β (IL-1 β)-induced chondrocyte apoptosis and inflammatory cytokine secretion, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** ①The mouse chondrocytes (ATDC5 cells) were harvested and cultured in the Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). After 24-hour culture, the ATDC5 cells were transfected with pcDNA-circ_0045714, pcDNA, si-circ_0045714, and si-NC, respectively, by using transfection reagents. ②The ATDC5 cells were inoculated onto the 96-well plates, with one group cultured in normal DMEM (normal group), one group in DMEM containing 10 ng/mL IL-1 β (IL-1 β group), and the rest in DMEM adding with 10 ng/mL IL-1 β and TTS with concentration of 25, 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. After 24-hour culture, the survival rate of chondrocytes in each group was calculated, based on which the concentration of TTS used in subsequent experiments was determined. ③The ATDC5 cells were divided into control group, IL-1 β group, IL-1 β + low-dose TTS (L-TTS) group, IL-1 β + medium-dose TTS (M-TTS) group, and IL-1 β + high-dose TTS (H-TTS) group. The ATDC5 cells in control group were cultured in conventional DMEM, the ones in IL-1 β group in DMEM with 10 ng/mL IL-1 β , and the ones in the other 3 groups in DMEM adding with 10 ng/mL IL-1 β and TTS with concentration of 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The pcDNA-circ_0045714- and pcDNA-transfected ATDC5 cells were cultured with the same method as IL-1 β group, and were labeled as IL-1 β + pcDNA-circ_0045714 group and IL-1 β + pcDNA group, respectively. The si-circ_0045714- and si-NC-transfected ATDC5 cells were cultured with the same method as IL-1 β + H-TTS group, and were labeled as IL-1 β + H-TTS + si-circ_0045714 group and IL-1 β + H-TTS + si-NC group, respectively. After 24-hour culture, the proliferation inhibition rate of the chondrocytes in each group was calculated. ④The ATDC5 cells and the pcDNA-circ_0045714-, pcDNA-, si-circ_0045714- and si-NC-transfected ATDC5 cells were inoculated onto the 6-well plates. After 12-hour culture, the apoptosis rate of chondrocytes in each group was detected by using flow cytometry. ⑤The culture medium of chondrocytes was collected from each group, and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) in the supernatant were detected. ⑥The total RNA was extracted from chondrocytes in each group for synthesizing the cDNA by reverse transcription, followed by amplification for calculating the expression level of circ_0045714 in chondrocytes. **Results:** ①The survival rate of chondrocytes was lower in IL-1 β group compared to normal group (LSD- t = 15.396, P = 0.000), and lower compared with that of IL-1 β + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTS group, IL-1 β + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTS group, IL-1 β + 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTS group and IL-1 β + 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTS group (LSD- t = 4.879, P = 0.047; LSD- t = 7.686, P = 0.001; LSD- t = 10.657, P = 0.000; LSD- t = 10.073, P = 0.000); while the differences between IL-1 β group and IL-1 β + 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTS group, and between IL-1 β + 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTS group and IL-1 β + 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTS group were not statistically significant (LSD- t = 1.555, P = 0.918; LSD- t = 0.584, P = 0.999). Therefore, the TTS with concentrations of 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were selected for the further experiments and were labeled as L-TTS group, M-TTS group, and H-TTS group, respectively, based on the concentrations. ②The proliferation inhi-

bition rate, the apoptosis rate, and the levels of TNF- α and IL-6 in the chondrocytes were higher in IL-1 β group compared with those of control group, IL-1 β + L-TTS group, IL-1 β + M-TTS group, and IL-1 β + H-TTS group (the proliferation inhibition rate: LSD- t = 55.829, P = 0.000; LSD- t = 8.879, P = 0.001; LSD- t = 20.507, P = 0.000; LSD- t = 30.315, P = 0.000; the apoptosis rate: LSD- t = 27.508, P = 0.000; LSD- t = 5.076, P = 0.032; LSD- t = 11.689, P = 0.000; LSD- t = 21.284, P = 0.000; the level of TNF- α in the chondrocytes: LSD- t = 29.990, P = 0.000; LSD- t = 7.720, P = 0.002; LSD- t = 17.182, P = 0.000; LSD- t = 24.615, P = 0.000; the level of IL-6 in the chondrocytes: LSD- t = 33.441, P = 0.000; LSD- t = 6.324, P = 0.008; LSD- t = 15.440, P = 0.000; LSD- t = 25.096, P = 0.000), and they were higher in IL-1 β + L-TTS group compared to IL-1 β + M-TTS group and IL-1 β + H-TTS group (the proliferation inhibition rate: LSD- t = 11.627, P = 0.000; LSD- t = 21.436, P = 0.000; the apoptosis rate: LSD- t = 6.613, P = 0.006; LSD- t = 16.209, P = 0.000; the level of TNF- α in the chondrocytes: LSD- t = 9.463, P = 0.000; LSD- t = 16.895, P = 0.000; the level of IL-6 in the chondrocytes: LSD- t = 9.117, P = 0.001; LSD- t = 18.773, P = 0.000), furthermore, they were higher in IL-1 β + M-TTS group compared to IL-1 β + H-TTS group (LSD- t = 9.808, P = 0.000; LSD- t = 9.595, P = 0.000; LSD- t = 7.432, P = 0.003; LSD- t = 9.656, P = 0.000). ③The expression level of circ_0045714 in the chondrocytes was lower in IL-1 β group compared to control group, IL-1 β + L-TTS group, IL-1 β + M-TTS group, and IL-1 β + H-TTS group (LSD- t = 43.218, P = 0.000; LSD- t = 9.487, P = 0.000; LSD- t = 22.136, P = 0.000; LSD- t = 34.785, P = 0.000), and was lower in IL-1 β + L-TTS group compared to IL-1 β + M-TTS group and IL-1 β + H-TTS group (LSD- t = 12.649, P = 0.000; LSD- t = 25.298, P = 0.000), moreover, it was lowly expressed in IL-1 β + M-TTS group compared to IL-1 β + H-TTS group (LSD- t = 12.649, P = 0.000). ④The expression level of circ_0045714 showed a significant difference in the chondrocytes transfected with pcDNA and pcDNA-circ_0045714 (1.00 ± 0.00 , 4.18 ± 0.14 , t = 39.342, P = 0.000), which indicated the chondrocytes with overexpression of circ_0045714 were successfully constructed. The difference in the expression level of circ_0045714 among the chondrocytes transfected with si-NC and si-circ_0045714 indicated the successful silencing of circ_0045714 in chondrocytes (1.00 ± 0.00 , 0.28 ± 0.04 , t = 31.177, P = 0.000). ⑤The IL-1 β + pcDNA-circ_0045714 group showed lower proliferation inhibition rate, apoptosis rate, and TNF- α and IL-6 levels in the chondrocytes compared to IL-1 β + pcDNA group (t = 16.290, P = 0.000; t = 11.359, P = 0.000; t = 11.988, P = 0.000; t = 12.266, P = 0.000). ⑥The IL-1 β + H-TTS + si-circ_0045714 group exhibited higher proliferation inhibition rate, apoptosis rate, and TNF- α and IL-6 levels in the chondrocytes compared to IL-1 β + H-TTS + si-NC group (t = 9.586, P = 0.001; t = 9.120, P = 0.001; t = 7.069, P = 0.002; t = 10.548, P = 0.001). **Conclusion:** The TTS can inhibit IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis and the expression of inflammatory cytokine, which has potential value in treatment of osteoarthritis. It may exert the effects by upregulating the expression of circ_0045714 in the chondrocytes, and the effects are stronger at the concentration of 200 μ g/mL.

Keywords osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis; fructus tribuli; saponins; interleukin-1 beta; RNA; circular; inflammation mediators

骨关节炎是一种以软骨细胞损伤、关节滑膜炎和软骨细胞外基质减少为特征的慢性退行性疾病,多见于中老年人^[1]。目前,药物治疗是骨关节炎的主要治疗方式,但长期使用非甾体抗炎药可能会对消化系统及肾脏造成损伤^[2]。因此,探寻一种安全、有效的药物来治疗骨关节炎显得尤为重要。刺蒺藜是我国传统中药之一,有研究^[3]发现,刺蒺藜对碘乙酸钠诱导的大鼠骨关节炎有改善作用,可降低骨关节炎大鼠软骨组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)的表达量;因此,刺蒺藜被视为骨关节炎的潜在治疗药物。蒺藜皂苷由刺蒺藜提炼而成,为刺蒺藜的主要活性成分。蒺藜皂苷能通过抑制 TNF- α 和 IL-6 的分泌减轻脑缺血再灌注大鼠脑组织的炎症反应^[4],还可抑制 TNF- α 和干扰素- γ 诱导的角质形成细胞 HaCaT 分泌

炎症因子^[5]。蒺藜皂苷的抗炎作用已被证实,然而,蒺藜皂苷是否为刺蒺藜发挥抗骨关节炎作用的有效成分,目前尚不明确。circ_0045714 是一种环状 RNA,可参与骨关节炎的发展进程。有研究^[6]发现,上调 circ_0045714 的表达可促进 TNF- α 诱导的软骨细胞生长,同时抑制细胞炎症反应和细胞外基质降解;因此, circ_0045714 可被视为骨关节炎的潜在治疗靶点。炎症反应可引起关节软骨细胞凋亡,进而导致软骨破坏。IL-1 β 是一种促炎细胞因子,可通过调节基质金属蛋白酶和炎症因子 (如 TNF- α 、IL-6) 的表达,诱导软骨细胞凋亡,从而参与骨关节炎的发展过程;因此, IL-1 β 常被用作诱导骨关节炎细胞模型的因子^[7]。为了观察蒺藜皂苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞的凋亡和炎症因子分泌的影响,并探讨其作用机制是否与 circ_0045714 有关,我们进行了相关研究,现报

告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

小鼠软骨细胞(ATDC5 细胞),购自南京科佰生物科技有限公司,批号 CBP60425。

1.2 实验试剂

羧基皂苷(西安首禾生物科技有限公司),DMEM 培养基、膜联蛋白 V (annexin V, AV)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒、二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒和 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),TNF- α 、IL-6 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),circ_0045714 过表达载体(pcDNA-circ_0045714)、小干扰 RNA (si-circ_0045714)、小干扰 RNA 阴性对照(si-NC)、PCR 引物、空载体(pcDNA)由上海吉凯基因公司合成,CCK-8 试剂盒、胎牛血清(上海碧云天生物技术有限公司),Trizol 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒(日本 Takara 公司)。

1.3 实验仪器

Synergy LX 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司),Mx3005P RT-qPCR 仪(美国 Stratagene 公司),FACS Calibur 流式细胞分析仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 实验方法

2.1.1 软骨细胞培养和转染 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液(完全培养液)复苏和培养 ATDC5 细胞。在 6 孔板接种对数期 ATDC5 细胞,每孔 2.5×10^5 个,培养 24 h 后弃培养液。采用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂分别转染 pcDNA-circ_0045714、pcDNA、si-circ_0045714、si-NC,转染 12 h 后改为完全培养液,培养 24 h 后收集软骨细胞待后续实验使用。

2.1.2 羧基皂苷浓度筛选 将 ATDC5 细胞按每孔 2.5×10^4 个接种于 96 孔板中,一组正常培养(正常组),一组加入 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-1 β ^[7],其他组在加入 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-1 β 同时分别加入浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羧基皂苷。培养 24 h 后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,孵育 2 h,检测 450 nm 处的吸光度(A)值,计算软骨细胞存活率,即(实验组 A 值/正常组 A 值) \times

100%。

2.1.3 软骨细胞增殖抑制率检测 于 96 孔板中接种 ATDC5 细胞及转染 pcDNA-circ_0045714、pcDNA、si-circ_0045714、si-NC 的 ATDC5 细胞,均为每孔 2.5×10^4 个,培养 12 h 后分组处理。将 ATDC5 细胞分为对照组、IL-1 β 组、IL-1 β + 羧基皂苷低剂量组、IL-1 β + 羧基皂苷中剂量组、IL-1 β + 羧基皂苷高剂量组,其中对照组采用常规培养液培养,IL-1 β 组采用含 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-1 β 培养液培养,IL-1 β + 羧基皂苷低剂量组、IL-1 β + 羧基皂苷中剂量组、IL-1 β + 羧基皂苷高剂量组分别采用含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羧基皂苷和 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-1 β 培养液培养,均培养 24 h。转染 pcDNA-circ_0045714、pcDNA 的 ATDC5 细胞,培养方法同 IL-1 β 组,并分别标记为 IL-1 β + pcDNA-circ_0045714 组、IL-1 β + pcDNA 组。转染 si-circ_0045714、si-NC 的 ATDC5 细胞,培养方法同 IL-1 β + 羧基皂苷高剂量组,并分别标记为 IL-1 β + 羧基皂苷高剂量 + si-circ_0045714 组、IL-1 β + 羧基皂苷高剂量 + si-NC 组。培养 24 h 后,向每孔中添加 CCK-8 试剂,每孔 10 μL 。继续培养 2 h 后,检测 450 nm 处的吸光度(A)值,计算软骨细胞增殖抑制率,即 $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

2.1.4 软骨细胞凋亡率检测 于 6 孔板中接种 ATDC5 细胞及转染 pcDNA-circ_0045714、pcDNA、si-circ_0045714、si-NC 的 ATDC5 细胞,均为每孔 1×10^6 个,培养 12 h 后分组处理。收集各组细胞,采用磷酸盐缓冲液洗涤后悬浮在 $1 \times$ 结合缓冲液中,调整细胞密度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 200 μL 细胞悬液,分别加入 5 μL AV-FITC 和 PI,混匀后在室温下避光反应 15 min,然后在 1 h 内用流式细胞仪检测各组软骨细胞凋亡率。

2.1.5 软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量检测 收集各组的软骨细胞培养液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,依据 TNF- α 和 IL-6 试剂盒指南检测上清液中 TNF- α 和 IL-6 含量。

2.1.6 软骨细胞中 circ_0045714 表达量检测 采用 Trizol 试剂提取各组软骨细胞中总 RNA,逆转录合成 cDNA,然后使用 SYBR Premix Ex Taq 进行 RT-qPCR 扩增,扩增引物序列见表 1。扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸

30 s,共 35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 circ_0045714 相对甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的表达量。

2.2 数据统计方法

采用 SPSS21.0 统计软件对所得数据进行统计分析。各组软骨细胞存活率的组间总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。对照组、IL-1 β 组及 IL-1 β + 不同浓度蒺藜皂苷组的软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 含量、软骨细胞中 IL-6 含量、circ_0045714 表达量的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验。转染 pcDNA 与 pcDNA-circ_0045714、转染 si-NC 与 si-circ_0045714 的软骨细胞中 circ_0045714 表达量比较,均采用 *t* 检验。IL-1 β + pcDNA 组与 IL-1 β + pcDNA-circ_0045714 组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-NC 组与 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-circ_0045714 组的软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 含量、软骨细胞中 IL-6 含量的组间比较均采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 软骨细胞存活率检测结果

各组软骨细胞存活率比较,差异有统计学意义。与正常组相比,IL-1 β 组的软骨细胞存活率降低(LSD-*t* = 15.396, *P* = 0.000)。IL-1 β 组与 IL-1 β + 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组的软骨细胞存活率比较,差异无统计学意义(LSD-*t* = 1.555, *P* = 0.918)。

IL-1 β + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组、IL-1 β + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组、IL-1 β + 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组、IL-1 β + 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组的软骨细胞存活率均高于 IL-1 β 组(LSD-*t* = 4.879, *P* = 0.047; LSD-*t* = 7.686, *P* = 0.001; LSD-*t* = 10.657, *P* = 0.000; LSD-*t* = 10.073, *P* = 0.000)。见表 2。

3.2 蒺藜皂苷浓度筛选结果

由于 IL-1 β + 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷与 IL-1 β + 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞存活率比较,差异无统计学意义(LSD-*t* = 0.584, *P* = 0.999),选择浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蒺藜皂苷,即低剂量组、中剂量组、高剂量组,进行后续实验。

3.3 软骨细胞增殖抑制率和凋亡率检测结果

各组软骨细胞增殖抑制率比较,差异有统计学意义。IL-1 β 组的软骨细胞增殖抑制率高于对照组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组(LSD-*t* = 55.829, *P* = 0.000; LSD-*t* = 8.879, *P* = 0.001; LSD-*t* = 20.507, *P* = 0.000; LSD-*t* = 30.315, *P* = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组的软骨细胞增殖抑制率高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组(LSD-*t* = 11.627, *P* = 0.000; LSD-*t* = 21.436, *P* = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组的软骨细胞增殖抑制率高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组(LSD-*t* = 9.808, *P* = 0.000)。见表 3。

表 1 实时荧光 PCR 引物序列

引物名称	上游引物序列(5'—3')	下游引物序列(5'—3')
circ_0045714	CGATAGCGTAGCGACGGC	CGGCTAGGCTCGTTACCGTC
GAPDH ¹⁾	CGATGATCTCTCGCGACCC	CGTAGCTGCAAGCGCAGC

注:1)为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

表 2 各组软骨细胞存活率检测结果

组别	样本量/孔	软骨细胞存活率/($\bar{x} \pm s, \%$)
正常组	3	100.00 \pm 0.00
IL ¹⁾ -1 β 组	3	40.39 \pm 6.27
IL ¹⁾ -1 β + 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组	3	46.41 \pm 6.20
IL ¹⁾ -1 β + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组	3	59.28 \pm 7.04
IL ¹⁾ -1 β + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组	3	70.15 \pm 7.29
IL ¹⁾ -1 β + 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组	3	81.65 \pm 8.33
IL ¹⁾ -1 β + 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷组	3	79.39 \pm 8.06
<i>F</i> 值		29.450
<i>P</i> 值		0.000

注:1)白细胞介素。

各组软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义。IL-1 β 组的软骨细胞凋亡率高于对照组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 27.508, P = 0.000; LSD- t = 5.076, P = 0.032; LSD- t = 11.689, P = 0.000; LSD- t = 21.284, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组的软骨细胞凋亡率高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 6.613, P = 0.006; LSD- t = 16.209, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组的软骨细胞凋亡率高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 9.595, P = 0.000)。见表 3、图 1。

3.4 软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量检测结果

各组软骨细胞中 TNF- α 含量比较,差异有统计学意义。IL-1 β 组的 TNF- α 含量高于对照组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 29.990, P = 0.000; LSD- t = 7.720, P = 0.002; LSD- t = 17.182, P = 0.000; LSD- t = 24.615, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组的 TNF- α 含量高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 9.463, P = 0.000; LSD- t = 16.895, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组的 TNF- α 含量高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 7.432, P = 0.003)。见表 3。

各组软骨细胞中 IL-6 含量比较,差异有统计学意义。IL-1 β 组的 IL-6 含量高于对照组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 33.441, P = 0.000; LSD- t = 6.324, P = 0.008; LSD- t = 15.440, P = 0.000; LSD- t = 25.096, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组的 IL-6 含量高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 9.117, P =

0.001; LSD- t = 18.773, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组的 IL-6 含量高于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 9.656, P = 0.000)。见表 3。

3.5 软骨细胞中 circ_0045714 表达量检测结果

各组软骨细胞中 circ_0045714 表达量比较,差异有统计学意义。IL-1 β 组软骨细胞中 circ_0045714 表达量低于对照组、IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组、IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 43.218, P = 0.000; LSD- t = 9.487, P = 0.000; LSD- t = 22.136, P = 0.000; LSD- t = 34.785, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷低剂量组软骨细胞中 circ_0045714 表达量低于 IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组和 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 12.649, P = 0.000; LSD- t = 25.298, P = 0.000)。IL-1 β + 蒺藜皂苷中剂量组软骨细胞中 circ_0045714 表达量低于 IL-1 β + 蒺藜皂苷高剂量组 (LSD- t = 12.649, P = 0.000)。见表 4。

3.6 过表达和干扰 circ_0045714 的软骨细胞构建结果

转染 pcDNA、pcDNA-circ_0045714 的软骨细胞中 circ_0045714 表达量比较,差异有统计学意义 (1.00 ± 0.00 , 4.18 ± 0.14 , t = 39.342, P = 0.000),说明过表达 circ_0045714 的软骨细胞构建成功。转染 si-NC、si-circ_0045714 的软骨细胞中 circ_0045714 表达量比较,差异有统计学意义 (1.00 ± 0.00 , 0.28 ± 0.04 , t = 31.177, P = 0.000),说明干扰 circ_0045714 的软骨细胞构建成功。

3.7 过表达 circ_0045714 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞影响结果

IL-1 β + pcDNA-circ_0045714 组的软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量均低于 IL-1 β + pcDNA 组 (表 5、图 2)。

表 3 软骨细胞增殖抑制率、凋亡率、细胞中 TNF- α 和 IL-6 含量检测结果

组别	样本量/孔	细胞增殖抑制率/ ($\bar{x} \pm s$, %)	细胞凋亡率/ ($\bar{x} \pm s$, %)	TNF- α ¹⁾ 含量/ ($\bar{x} \pm s$, pg \cdot mL ⁻¹)	IL ²⁾ -6 含量/ ($\bar{x} \pm s$, pg \cdot mL ⁻¹)
对照组	3	0.00 \pm 0.00	8.21 \pm 0.76	171.12 \pm 11.15	35.83 \pm 4.81
IL ²⁾ -1 β 组	3	57.09 \pm 1.75	23.06 \pm 1.12	399.82 \pm 13.92	203.83 \pm 10.52
IL ²⁾ -1 β + 蒺藜皂苷低剂量组	3	48.01 \pm 2.13	20.32 \pm 0.93	340.95 \pm 9.98	172.06 \pm 9.33
IL ²⁾ -1 β + 蒺藜皂苷中剂量组	3	36.12 \pm 1.63	16.75 \pm 1.04	268.79 \pm 10.53	126.26 \pm 8.98
IL ²⁾ -1 β + 蒺藜皂苷高剂量组	3	26.09 \pm 2.33	11.57 \pm 0.77	212.11 \pm 18.54	77.75 \pm 8.78
F 值		466.453	128.142	148.878	184.210
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)肿瘤坏死因子- α ;2)白细胞介素。

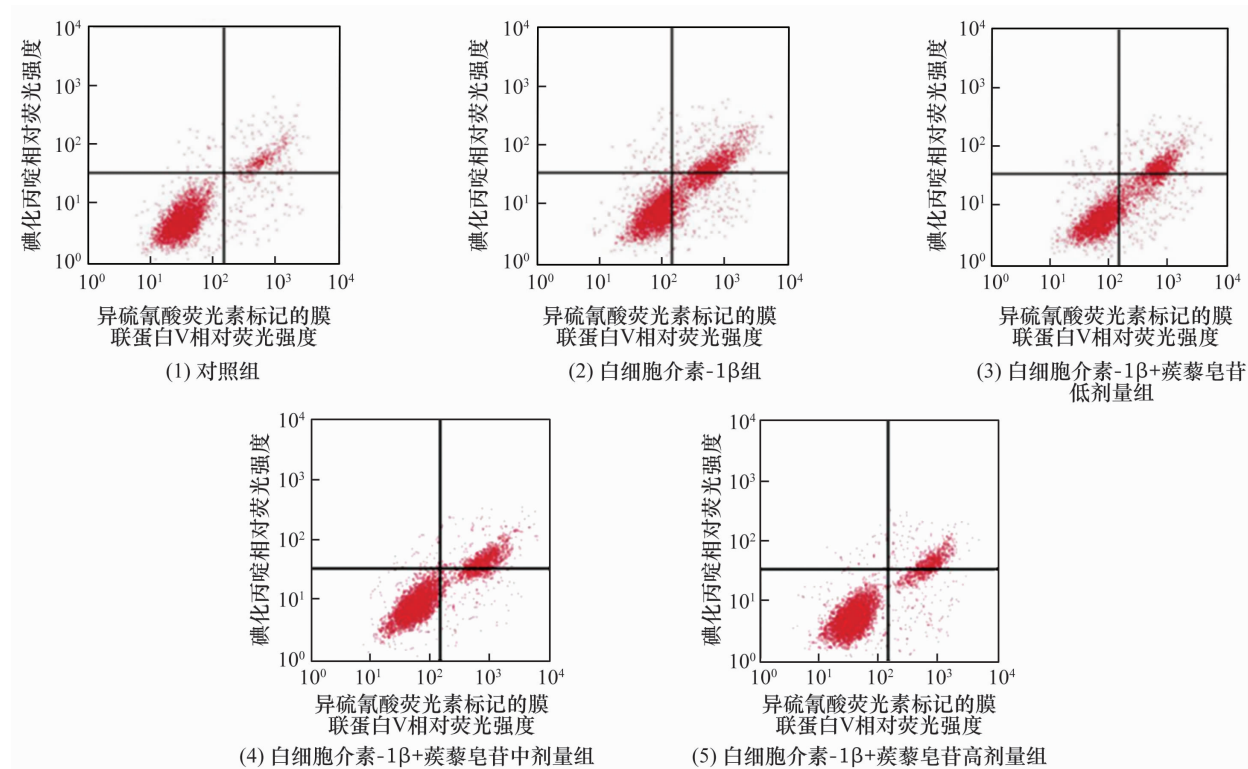


图 1 各组软骨细胞凋亡率测定结果

表 4 软骨细胞中 circ_0045714 表达量检测结果

组别	样本量/孔	Circ_0045714 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	3	1.00 ± 0.00
IL ¹⁾ -1β 组	3	0.18 ± 0.02
IL ¹⁾ -1β + 蒺藜皂苷低剂量组	3	0.36 ± 0.03
IL ¹⁾ -1β + 蒺藜皂苷中剂量组	3	0.60 ± 0.04
IL ¹⁾ -1β + 蒺藜皂苷高剂量组	3	0.84 ± 0.05
F 值		313.555
P 值		0.000

注:1) 白细胞介素。

表 5 过表达 circ_0045714 对白细胞介素-1β 诱导的软骨细胞增殖、凋亡及炎症因子表达的影响结果

组别	样本量/孔	细胞增殖抑制率/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	细胞凋亡率/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	TNF- α ¹⁾ 含量/ ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL ²⁾ -6 含量/ ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
IL ²⁾ -1β + pcDNA 组	3	57.22 ± 2.22	23.10 ± 1.27	400.61 ± 16.49	203.31 ± 13.80
IL ²⁾ -1β + pcDNA-circ_0045714 组	3	29.18 ± 1.99	12.62 ± 0.97	235.64 ± 17.21	94.64 ± 6.71
t 值		16.290	11.359	11.988	12.266
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

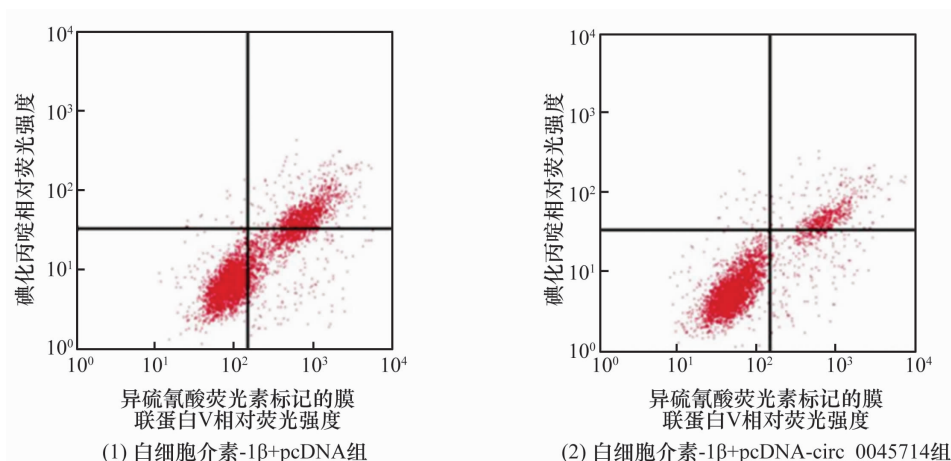
注:1) 肿瘤坏死因子-α;2) 白细胞介素。

3.8 干扰 circ_0045714 对 IL-1β 诱导的软骨细胞影响结果

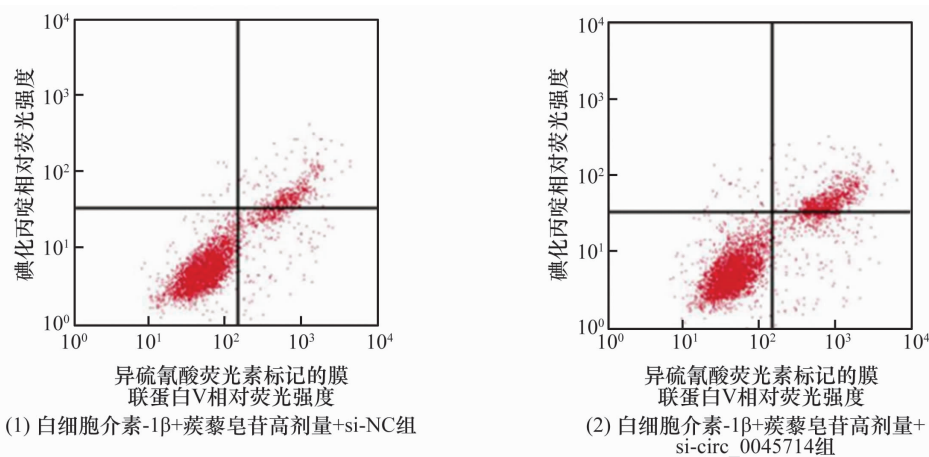
IL-1β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-circ_0045714 组软骨细胞增殖抑制率、软骨细胞凋亡率、软骨细胞中 TNF-α 和 IL-6 含量均高于 IL-1β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-NC 组(表 6、图 3)。

4 讨论

骨关节炎是一种慢性关节疾病,好发于中老年人,可严重影响患者的生活质量。炎症反应可能导致软骨细胞受损,进而诱导软骨细胞凋亡,这是骨关节炎发生发展的主要原因之一^[8-9]。IL-1β 在骨关节炎的发生发展过程中具有重要作用,它能促进软骨细胞

图2 过表达 circ_0045714 对白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡率测定结果表6 干扰 circ_0045714 对白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞增殖、凋亡及炎症因子表达的影响结果

组别	样本量/ 孔	细胞增殖抑制率/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	细胞凋亡率/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	TNF- α ¹⁾ 含量/ ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6 ²⁾ 含量/ ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
IL ²⁾ -1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-NC 组	3	25.77 \pm 2.71	11.35 \pm 0.40	215.52 \pm 23.30	74.69 \pm 6.79
IL ²⁾ -1 β + 蒺藜皂苷高剂量 + si-circ_0045714 组	3	47.91 \pm 2.96	18.16 \pm 1.23	334.81 \pm 17.65	153.78 \pm 11.07
<i>t</i> 值		9.586	9.120	7.069	10.548
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.002	0.001

注:1)肿瘤坏死因子- α ;2)白细胞介素。图3 干扰 circ_0045714 对白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡率的影响结果

凋亡,因此常被用作软骨细胞损伤的诱导剂^[10-11]。有研究^[12]发现,IL-1 β 与 TNF- α 协同作用,能够促进软骨基质降解,从而破坏关节软骨。TNF- α 能够诱导 IL-6 的产生,可进一步加剧关节软骨的破坏^[13]。本研究发现,软骨细胞经过 IL-1 β 处理后,细胞的增殖活性降低、凋亡率升高,同时 TNF- α 和 IL-6 的含量增加,表明 IL-1 β 可能诱导了软骨细胞的凋亡过程,并促进了炎症反应的发生,这与既往的研究结果^[10-11]一致,说明我们成功构建了软骨细胞损伤模型。

蒺藜皂苷是刺蒺藜的主要活性成分,易溶于水,

具有抗肿瘤^[14]、抗炎^[15]和降血糖^[16]等功能。有研究^[17]表明,蒺藜皂苷可通过调节多种代谢途径,发挥抗缺血性脑卒中的作用。蒺藜皂苷可能通过其抗氧化作用,减轻心肌细胞因缺血再灌注所受到的损伤^[18]。Park 等^[3]研究发现,刺蒺藜可降低骨关节炎大鼠软骨中 TNF- α 和 IL-6 的表达量,从而改善由碘乙酸钠诱导的大鼠骨关节炎症状,这表明刺蒺藜可能是骨关节炎的潜在治疗药物。本研究发现,蒺藜皂苷能够以剂量依赖性的方式降低 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡率、TNF- α 和 IL-6 含量,这表明蒺藜皂苷可抑

制 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤和凋亡。此外,高剂量蒺藜皂苷的作用效果优于中、低剂量蒺藜皂苷,这表明高剂量蒺藜皂苷可能具有治疗骨关节炎的潜在价值。

circRNA 是一类呈闭合环状的非编码 RNA,可参与调控细胞的增殖、分化、凋亡及炎症等过程,对包括骨关节炎在内的多种疾病具有重要作用^[19-21]。研究^[22-24]表明,多种 circRNA,如 circ_UBE2G1、circ_SERPINE2 和 circ_PSM3 等,可参与调控骨关节炎软骨细胞损伤,为骨关节炎的治疗提供了潜在的分子靶标。circ_0045714 在骨关节炎患者关节软骨细胞中的表达量较低,circ_0045714 的高表达可以缓解由 IL-1 β 诱导的人关节软骨细胞凋亡、炎症反应及基质降解^[25]。Li 等^[26]研究发现,circ_0045714 可通过靶向下调 miR-193b 来抑制软骨细胞的细胞外基质降解及细胞凋亡,从而减轻软骨细胞损伤。本研究发现,采用 IL-1 β 进行干预可降低软骨细胞中 circ_0045714 的表达量,而 circ_0045714 的过表达可抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和炎症反应,这一发现与 Li 等^[26]的研究结果一致,表明 circ_0045714 可能是影响骨关节炎患者软骨细胞功能恢复的潜在基因,并可能作为治疗骨关节炎的分子靶点。

此外,本研究发现,蒺藜皂苷可呈剂量依赖性地促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞中 circ_0045714 的表达;因此,我们推测蒺藜皂苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的抑制作用可能与调控 circ_0045714 的表达量有关。为了验证这一推测,本研究在采用蒺藜皂苷干预的基础上,采用小分子干扰技术来沉默软骨细胞中 circ_0045714 的表达,结果显示,沉默 circ_0045714 的表达削弱了蒺藜皂苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及炎症因子表达的抑制作用,表明蒺藜皂苷可能通过上调 circ_0045714 的表达来抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及炎症反应。

本研究结果显示,蒺藜皂苷能抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及炎症因子表达,具有治疗骨关节炎的潜在价值,其作用机制可能与上调软骨细胞中 circ_0045714 表达有关,且 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒺藜皂苷的效果更佳。然而,环状 RNA 在骨关节炎中的潜在调控网络尚需进一步研究,circ_0045714 在骨关节炎发病机制中的下游基因和相关信号通路尚未完全明确,而且蒺藜皂苷治疗骨关节炎的疗效尚需在体内模型中进

一步验证。

参考文献

- [1] DUAN L, DUAN D, WEI W, et al. MiR-19b-3p attenuates IL-1 β induced extracellular matrix degradation and inflammatory injury in chondrocytes by targeting GRK6 [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 459(1-2): 205-214.
- [2] 常青, 王伟, 杨增华, 等. 黄芩苷对 IL-1 β 诱导大鼠软骨细胞凋亡和炎症反应的抑制作用及相关机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(21): 2603-2607.
- [3] PARK Y J, CHO Y R, OH J S, et al. Effects of Tribulus terrestris on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis pain in rats [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 5303-5311.
- [4] 翟凤国, 周福波, 李厚忠, 等. 蒺藜皂苷对脑缺血再灌注大鼠炎性细胞因子表达的影响 [J]. 牡丹江医学院学报, 2014, 35(5): 4-6.
- [5] 李桂双, 卜洁琼, 龙剑文. 蒺藜皂苷抑制肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 诱导 HaCaT 细胞的炎症反应 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(2): 131-137.
- [6] JIANG H, DAI J, ZHANG C, et al. Circ_0045714 alleviates TNF- α -induced chondrocyte injury and extracellular matrix degradation through miR-218-5p/HRAS axis [J]. J Bioenerg Biomembr, 2021, 53(1): 97-107.
- [7] 齐秀春, 陈昕, 曹玉净, 等. 雷公藤多苷通过 Wnt/ β -catenin 缓解 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 2890-2896.
- [8] LI G, TAN W, FANG Y, et al. circFADS2 protects LPS-treated chondrocytes from apoptosis acting as an interceptor of miR-498/mTOR cross-talking [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(10): 3348-3361.
- [9] 熊杰, 匡浩铭, 钟秀远, 等. 铁包金按摩膏联合刮法对膝骨关节炎模型兔关节软骨 IL-1 β 、TNF- α 及 A20 蛋白表达的影响 [J]. 中医药导报, 2022, 28(5): 42-46.
- [10] 张安琪, 郑福增, 周子朋, 等. 女贞子多糖对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞损伤和炎症反应的作用 [J]. 中成药, 2022, 44(5): 1447-1453.
- [11] 汪珏, 郑林峰, 徐进, 等. 骨碎补总黄酮对 IL-1 β 诱导体外软骨细胞损伤的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1441-1447.
- [12] 全惠琳, 郇宇, 胡学昱. 褪黑素对 IL-1 β /TNF- α 诱导终板软骨细胞黏附减少的作用和机制 [J]. 空军军医大学学报, 2022, 43(5): 444-449.
- [13] LIU C, REN S, ZHAO S, et al. LncRNA MALAT1/MiR-145 adjusts IL-1 β -induced chondrocytes viability and cartilage matrix degradation by regulating ADAMTS5 in human osteoarthritis [J]. Yonsei Med J, 2019, 60(11): 1081-1092.

- [14] 王艳霞. 蒺藜皂苷通过上调 PDCD4 表达阻滞肺癌 A549 细胞周期并诱导细胞凋亡[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 1894-1898.
- [15] 朱克春, 马萍. 蒺藜总皂苷对 LPS 诱导的巨噬细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-2、NO 的影响和机制[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(16): 1958-1963.
- [16] 张素军, 冯尚彩. 蒺藜皂苷对正常和 2 型糖尿病大鼠餐后血糖水平的影响[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(1): 1-3.
- [17] WANG Y, GUO W, LIU Y, et al. Investigating the protective effect of gross saponins of Tribulus terrestris fruit against ischemic stroke in rat using metabolomics and network pharmacology[J]. Metabolites, 2019, 9(10): 240.
- [18] 张爽, 李红, 梁蕾, 等. 蒺藜皂苷预适应对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2010, 36(2): 229-232.
- [19] TAO S C, HUANG J Y, GAO Y, et al. Small extracellular vesicles in combination with sleep-related circRNA3503: a targeted therapeutic agent with injectable thermosensitive hydrogel to prevent osteoarthritis[J]. Bioact Mater, 2021, 6(12): 4455-4469.
- [20] LI H, LIU Z, GUO X, et al. Circ_0128846/miR-140-3p/JAK2 network in osteoarthritis development[J]. Immunol Invest, 2022, 51(6): 1529-1547.
- [21] YUAN X, ZHANG Y, CAI C, et al. Circular RNA circ-ZNF652 is overexpressed in osteoarthritis and positively regulates LPS-induced apoptosis of chondrocytes by upregulating PTEN[J]. Autoimmunity, 2021, 54(7): 415-421.
- [22] CHEN G, LIU T, YU B, et al. CircRNA-UBE2G1 regulates LPS-induced osteoarthritis through miR-373/HIF-1 α axis[J]. Cell Cycle, 2020, 19(13): 1696-1705.
- [23] SHEN S, WU Y, CHEN J, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(6): 826-836.
- [24] NI J L, DANG X Q, SHI Z B. CircPSM3 inhibits the proliferation and differentiation of OA chondrocytes by targeting miRNA-296-5p[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7): 3467-3475.
- [25] DING R, ZHOU J, XU J, et al. Circ_0045714/miR-331-3p interaction affects IL-1 β -evoked human articular chondrocyte injury through regulating PIK3R3 in a ceRNA regulatory cascade[J]. J Orthop Surg Res, 2021, 16(1): 595.
- [26] LI B F, ZHANG Y, XIAO J, et al. Hsa_circ_0045714 regulates chondrocyte proliferation, apoptosis and extracellular matrix synthesis by promoting the expression of miR-193b target gene IGF1R[J]. Hum Cell, 2017, 30(4): 311-318.

(收稿日期: 2023-07-14 本文编辑: 郭毅曼)

(上接第 13 页)

- [39] 杨洁, 张哲, 赵慧慧. 功能锻炼对骨质疏松椎体压缩性骨折患者术后康复效果的系统评价[J]. 当代护士(上旬刊), 2022, 29(2): 6-11.
- [40] 蓝桂森. 腰背肌功能锻炼对骨质疏松性椎体压缩骨折患者的作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(17): 3335.
- [41] 赵坚, 吴宝玲, 段贤斌. 早期功能锻炼对骨质疏松症合并椎体骨折患者骨痛及骨密度的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(18): 3651.
- [42] 秦大平, 张晓刚, 宋敏, 等. 老年骨质疏松性胸腰椎压缩骨折治疗研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 679-684.
- [43] 彭楠, 肖四旺. 中药内服外用配合功能锻炼对骨质疏松性椎体压缩性骨折 PKP 术后疼痛及功能恢复的影响[J]. 中国现代医生, 2022, 60(5): 89-93.
- [44] 沙凯. 改良八段锦功法应用于骨质疏松性椎体压缩性骨折 PVP/PKP 术后早期康复的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [45] 梁丽霞, 林松, 刘利花, 等. 八段锦操对腰椎骨折术后病人康复效果的影响研究[J]. 护理研究, 2019, 33(6): 1090-1092.
- [46] 陈燕, 熊兴娟, 刘浩, 等. 八段锦对原发性骨质疏松症患者疼痛及生活质量的影响[J]. 中国民间疗法, 2017, 25(3): 18-19.
- [47] 何伟涛, 孙全谔, 史晓林. 太极拳与原发性骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(8): 587-590.
- [48] LEMS W F, RATERMAN H G. Critical issues and current challenges in osteoporosis and fracture prevention. An overview of unmet needs[J]. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2017, 9(12): 299-316.
- [49] 阚丽君, 李静伟, 潘定权, 等. 改良五禽戏配合穴位敷贴治疗骨质疏松性椎体骨折的临床疗效观察[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014(8): 924-926.
- [50] 黄斗权, 刘蔚楠. 五禽戏之鹿戏对骨质疏松性椎体骨折术后患者早期康复的临床研究[J]. 中外医学研究, 2018, 16(21): 7-9.

(收稿日期: 2023-08-10 本文编辑: 李晓乐)