

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

汪珏, 郑林峰, 徐进, 詹荣飞(淳安新富中医骨伤医院骨伤科, 杭州 311700)

摘要: 目的 探究骨碎补总黄酮(total flavones of *Drynariae Rhizoma*, TFDR)对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用及相关机制。方法 分离并培养 SD 大鼠软骨细胞,采用 CCK8 法检测不同浓度的 TFDR 对软骨细胞增殖的影响以及 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的影响;采用 ELISA 试剂盒检测 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞中炎症因子的影响;采用 Hoechst 33342 染色法检测 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响;qRT-PCR 和 Western blotting 检测凋亡相关因子和骨关节炎相关因子的表达情况。结果 不同浓度的 TFDR 能够在不同程度上促进软骨细胞的增殖;与对照组相比,IL-1 β 诱导的软骨细胞活性显著降低,炎症因子表达显著升高,细胞凋亡显著增加;IL-1 β 诱导的软骨细胞经 TFDR 干预后,细胞活性增加,炎症因子表达下降,细胞凋亡受到抑制。IL-1 β 诱导的软骨细胞中 iNOS、COX-2、MMP-13、ADAMTS-5、Bax、Caspase-3 mRNA 表达均显著增强, collagen-II、aggrecan、Bcl-2 表达均显著降低;经 TFDR 处理后, iNOS、COX-2、MMP-13、ADAMTS-5、Bax、Caspase-3 mRNA 表达降低, collagen-II、aggrecan、Bcl-2 表达升高。结论 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤具有一定的保护作用,其机制和调控炎症反应、抑制细胞凋亡相关。

关键词: 骨碎补总黄酮;软骨细胞;炎症;凋亡

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2021)12-1441-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.006

引用本文: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.

Protective Effect of Total Flavones of *Drynariae Rhizoma* on IL-1 β Induced Chondrocyte Injury *in Vitro*

WANG Jue, ZHENG Linfeng, XU Jin, ZHAN Rongfei(Department of Orthopedics and Traumatology, Chun'an Xinfu Traditional Chinese Medicine Bone Injury Hospital, Hangzhou 311700, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of total flavones of *Drynariae Rhizoma*(TFDR) on IL-1 β induced chondrocyte injury and its related mechanism. **METHODS** The chondrocytes of SD rats were isolated and cultured. The effects of TFDR at different concentrations on chondrocytes proliferation and IL-1 β induced chondrocytes proliferation were determined by CCK8 assay. The effects of TFDR on inflammatory cytokines in IL-1 β induced chondrocytes were examined using ELISA kit; Hoechst 33342 staining was used to detect the effect of TFDR on IL-1 β induced chondrocyte apoptosis; qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of factors related to apoptosis and osteoarthritis. **RESULTS** Different concentrations of TFDR could promote the proliferation of chondrocytes in different degrees. Compared with control group, IL-1 β induced chondrocytes were significantly reduced in activity, inflammatory factor expression was significantly increased, and apoptosis was significantly increased. After TFDR intervention, the proliferation activity were significantly increased, inflammatory factor expression was decreased, and apoptosis was inhibited. iNOS, COX-2, MMP-13, ADAMTS-5, Bax and Caspase-3 mRNA expression were significantly increased in IL-1 β induced chondrocytes, while collagen II, aggrecan and Bcl-2 expression were significantly decreased. After TFDR treatment, expressions of iNOS, COX-2, MMP-13, ADAMTS-5, Bax and Caspase-3 mRNA were decreased, and collagen II and aggrecan and Bcl-2 expression were increased. **CONCLUSION** TFDR has a protective effect on IL-1 β induced chondrocyte injury, and its mechanism is related to the regulation of inflammatory response and apoptosis.

KEYWORDS: total flavones of *Drynariae Rhizoma*; chondrocyte; inflammation; apoptosis

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是目前临床常见的难治性慢性退行性关节病变,发病率逐年增高^[1-2]。OA 的发生有多种因素参与,其中,软骨细胞的增殖受限和凋亡异常扮演着十分重要的角色,而参与软骨细胞凋亡的细胞因子和通路的表达异常是

其中一个重要原因^[3]。目前西医治疗 OA 的方法十分局限,而中医药有效成分在 OA 防治方面疗效可靠、不良反应少,具有较好的应用前景^[4]。

骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei*(Kunze)J.Sm.的干燥根茎,具有补肾强骨,

基金项目: 杭州市科技计划项目(20185020)

作者简介: 汪珏,女,副主任医师

Tel: 13868190117

E-mail: Wangjuezh@163.com

续伤止痛的作用,其主要成分是骨碎补总黄酮(total flavones of *Drynariae Rhizoma*, TFDR)^[5]。TFDR具有明显的镇痛、抗炎及对骨折的修复作用^[6],但其涉及的相关机制还有待进一步的研究。因此,本研究利用 IL-1 β 诱导软骨细胞,模拟 OA 炎症内环境,探讨 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用及相关机制,为 OA 指导临床用药和新药开发提供新的理论基础。

1 材料

1.1 动物

10 只新生 SD 大鼠,♂,SPF 级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物生产许可证号为 SCXK(沪)2013-0018,动物质量合格证号为 2016000457856;饲养于浙江中医药大学实验动物研究中心,动物使用许可证号为 SYXK(浙)2013-0184。饲养条件:室温为(23±2)℃,相对湿度为 60%~70%。

1.2 药物及试剂

TFDR(强骨胶囊,北京岐黄制药有限公司,规格:每粒 0.25 g;含 TFDR 有效成分为每粒 0.18 g;批号:181011);取强骨胶囊内容物于蒸馏水中,配置成 TFDR 含量为 1 g·L⁻¹ 的母液,-20℃ 储存备用;IL-1 β (美国 PeproTech 公司,批号:20180103);胎牛血清、DMEM 细胞培养液(美国 Gibco 公司,批号:20190305);TNF- α 、IL-6、PGE2、NO ELISA 检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号:746242,746354,746356,746221);II 型胶原酶、Hoechst 33342(美国 Sigma 公司,批号:M2230,M3115);NOS、COX-2、MMP-13、Bax、Bcl-2、Caspase-3、GAPDH 抗体(美国 CST 公司,货号:#13120,#12282,#69926,#14796,#15071,#14220,#5174);collagen-II、aggrecan、ADAMTS-5 抗体(Abcam 公司,批号:ab34712,ab3778,ab41037);qRT-PCR 反转录试剂盒和 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR Kit(日本 Takara 公司,批号:20191211,20191108)。

1.3 仪器

BBS-H1800 型超净工作台(山东博科科学仪器有限公司);WJ-80A-II 细胞培养箱(郑州安晟科学仪器有限公司);3300Mini 化学发光成像系统(中国 CLInX 公司);电泳仪(伯乐生命医学产品上海有限公司);7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 软骨细胞的分离与培养

用颈椎脱臼法将 SD 新生大鼠处死,置于酒精中浸泡 2~3 min,随后在超净工作台上进行股骨髁及胫骨处的关节软骨刮取,整个实验在无菌条件下进行,将取得的关节软骨用无菌 PBS 缓冲液冲洗 3 次,用剪刀剪碎,加入 5 mL 0.2% II 型胶原酶,放入细胞培养箱,37℃ 消化,每隔 2 h 收集 1 次上清液,1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,加入 DMEM 完全培养基,重悬后收集于细胞培养皿中,然后放进 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内进行培养,培养至 3 d 后更换 1 次新鲜培养液,后每 2 d 更换 1 次,当细胞量达到 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,以 1:4 的比例传代,最后取第 3 代软骨细胞进行后续试验。

2.2 细胞分组及处理

2.2.1 CCK8 法检测不同浓度 TFDR 对软骨细胞增殖的影响 将第 3 代软骨细胞接种于 96 孔板(每孔 3 000 个),设立 6 组,分别为空白对照组,10⁻⁷,10⁻⁶,10⁻⁵,10⁻⁴,10⁻³ g·L⁻¹ TFDR 药物组,待细胞贴壁后,根据分组情况加入相应浓度的 TFDR,随后放置 37℃ 细胞培养箱内培养 8 h,吸取上清液,往每孔加 100 μ L 含 CCK8 试剂的完全细胞培养基,继续培养 3 h,用酶标仪检测各孔 OD 值,检测波长为 450 nm。

2.2.2 CCK8 法检测不同浓度 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的影响 将第 3 代软骨细胞分为 5 组,依次为对照组(PBS)、模型组(10 ng·mL⁻¹ IL-1 β)、TFDR 低剂量组(10 ng·mL⁻¹ IL-1 β +10⁻⁶ g·L⁻¹ TFDR)、TFDR 中剂量组(10 ng·mL⁻¹ IL-1 β +10⁻⁵ g·L⁻¹ TFDR)、TFDR 高剂量组(10 ng·mL⁻¹ IL-1 β +10⁻⁴ g·L⁻¹ TFDR)。经上述处理后共培养 24 h,用 CCK8 试剂检测细胞活性。

2.2.3 ELISA 法检测不同浓度 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞 IL-6、TNF- α 、NO、PGE2 表达的影响 将第 3 代软骨细胞接种于 96 孔板中(每孔 5 000 个),孵育 24 h 后,按“2.2.2”项下分为 5 组。经处理后培养 24 h,除去细胞上清液,用 ELISA 试剂盒检测各组的 IL-6、TNF- α 、NO、PGE2 的表达情况。

2.2.4 Hoechst 33342 染色法观察 TFDR 对软骨细胞核凋亡的影响 将第 3 代软骨细胞培养于 6 孔板,待细胞贴壁后,按“2.2.2”项下分为 5 组。

经处理后培养 24 h, 先用 PBS 缓冲液洗 3 遍, 用固定液固定 5 min; 再用 PBS 缓冲液洗 3 遍, 用 Hoechst 33242 工作液染色处理 15 min; 最后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 用荧光显微镜观察细胞核变化情况。

2.2.5 qRT-PCR 检测软骨细胞相关基因的表达情况 将第 3 代软骨细胞传代于 6 孔板, 待生长至 80%, 将细胞按“2.2.2”项下分为 5 组。经处理后培养 24 h 后, 用 Trizol 提取各组细胞核酸, 然后通过反转录成 cDNA, 最后用 qRT-PCR 试剂盒检测各组 ADAMTS-5、Bax、Bcl-2、Caspase-3、iNOS、COX-2、collagen-II、aggrecan、MMP-13 基因的表达情况, 以 GAPDH 为内参, 检测结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析。

2.2.6 Western blotting 检测软骨相关蛋白的表达情况 将第 3 代软骨细胞传代于 6 孔板, 待生长至 80%, 将细胞按“2.2.2”项下分为 5 组。经处理后培养 24 h, 提取各组细胞的总蛋白, 检测各组 ADAMTS-5、Bax、Bcl-2、Caspase-3、iNOS、COX-2、collagen-II、aggrecan、MMP-13 的蛋白表达情况, GAPDH 为内参。提取的蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 一抗 4℃ 孵育过夜, 用 PBST 缓冲液洗膜 3 次, 再加二抗室温孵育 2 h, PBST 缓冲液洗膜 3 次, 最后用化学发光成像系统扫描与分析。

2.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间两两比较采用单因素方差分析; 组间两两比较, 采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度的 TFDR 对软骨细胞增殖的影响

与对照组相比, 不同浓度的 TFDR 对软骨细胞的增殖有不同程度的促进作用, 其中 TFDR 浓度为 $10^{-7} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 无显著性差异。TFDR 浓度达到 $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时软骨细胞的相对活力显著升高 ($P < 0.05$), 且在浓度达到 $10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 TFDR 的增殖促进作用开始下降。TFDR 浓度为 $10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对软骨细胞的促增殖作用最强。结果见图 1。

3.2 不同浓度的 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的影响

与对照组相比, 模型组软骨细胞活性明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, TFDR 中、高剂量组

细胞活性显著增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 TFDR 低剂量组细胞活性较模型组无明显变化。结果见图 2。

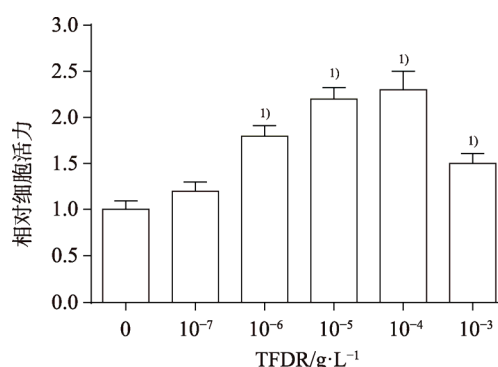


图 1 不同浓度的 TFDR 对软骨细胞增殖的影响
与对照组(TFDR $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Effects of different concentrations of TFDR on the proliferation of chondrocyte
Compared with control group(TFDR $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P < 0.05$.

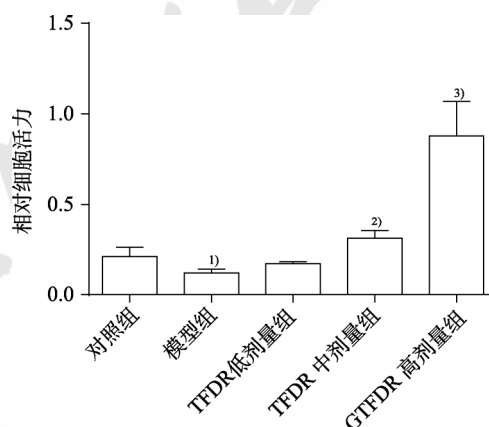


图 2 不同浓度的 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞活性的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effects of different concentrations of TFDR on activity of IL-1 β induced chondrocyte
Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

3.3 不同浓度 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞 TNF- α 、IL-6、PGE2、NO 表达的影响

与对照组相比, 模型组细胞中 TNF- α 、IL-6、PGE2、NO 表达量均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 表明模型组细胞已产生明显的炎症反应。与模型组相比, TFDR 中、高剂量组 TNF- α 、IL-6 表达量显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TFDR 各剂量组 PGE2、NO 表达量均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表 1。

3.4 不同浓度 TFDR 对软骨细胞核凋亡的影响

对照组软骨细胞形态完整, 大小均一, 染色均匀, 而模型组的软骨细胞多数出现体积变小,

胞质浓缩,细胞核裂解,表明凋亡细胞数目增多。不同浓度的 TFDR 处理后,发生核皱缩的凋亡细胞数量逐渐减少,结果见图 3。该结果表明 TFDR 能够有效抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡。

表 1 不同浓度 TFDR 对软骨细胞炎症因子表达的影响
Tab. 1 Effects of different concentrations of TFDR on the expression of inflammatory cytokines in chondrocytes

组别	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	PGE2/pg·mL ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹
对照组	159.6 $\pm$ 16.3	32.0 $\pm$ 4.9	174.9 $\pm$ 14.4	40.7 $\pm$ 2.3
模型组	670.7 $\pm$ 53.6 ¹⁾	165.8 $\pm$ 13.2 ¹⁾	1 558.8 $\pm$ 78.6 ²⁾	137.9 $\pm$ 12.8 ¹⁾
TFDR 低剂量组	573.9 $\pm$ 15.8	148.2 $\pm$ 6.3	1 204.0 $\pm$ 97.5 ³⁾	89.6 $\pm$ 4.4 ³⁾
TFDR 中剂量组	359.6 $\pm$ 11.9 ³⁾	126.9 $\pm$ 4.7 ³⁾	919.0 $\pm$ 48.2 ⁴⁾	70.1 $\pm$ 2.9 ³⁾
TFDR 高剂量组	226.2 $\pm$ 16.0 ⁴⁾	84.4 $\pm$ 10.4 ⁴⁾	731.7 $\pm$ 98.6 ⁴⁾	60.3 $\pm$ 8.0 ³⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$,²⁾ $P<0.001$;与模型组比较,³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

3.5 不同浓度 TFDR 对软骨细胞相关基因表达的影响

用 qRT-PCR 法检测各组软骨细胞相关基因的表达情况,结果见图 4。与对照组相比,模型组中 iNOS、COX-2、MMP-13、ADAMTS-5、Bax、Caspase-3 mRNA 表达水平均显著增强($P<0.01$), Bcl-2、collagen-II、aggrecan mRNA 表达显著降低($P<0.01$);与模型组相比,TFDR 加药组中 iNOS、COX-2、MMP-13、ADAMTS-5、Bax、Caspase-3 mRNA 表达显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$), collagen-II、Bcl-2、aggrecan mRNA 表达显著升高

($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.6 不同浓度 TFDR 对软骨细胞相关蛋白表达的影响

从蛋白层面进一步分析 TFDR 对软骨细胞的影响,Western blotting 检测结果见图 5。与对照组相比,模型组中 iNOS、COX-2、MMP-13、ADAMTS-5、Bax、Caspase-3 蛋白表达均显著增强($P<0.01$), Bcl-2、collagen-II、aggrecan 蛋白表达均显著降低($P<0.01$);而经不同浓度的 TFDR 处理后, iNOS、COX-2、MMP-13、ADAMTS-5、Bax、Caspase-3 蛋白降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Bcl-2、collagen-II、aggrecan 蛋白升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

4 讨论

OA 是一种以关节软骨的变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节疾病,临床上好发于中老年患者,且女性多于男性^[7-9]。目前中医治疗 OA 方面疗效显著,方法较多,是治疗 OA 的有效手段^[10],本实验中所用的 TFDR 具有补肾、强骨、止痛的功效^[11]。近年来研究发现,TFDR 对 OA 有很好的预防和治疗作用^[12]。然而,其具体的保护方式及相关的机制并未被完全阐明。IL-1 β 具有诱导产生多种炎症因子的作用,同时还能够抑制 II 型胶原的合成,使软骨周围环境发生改变,最终导致软骨破坏^[13],因此,IL-1 β 常被用作 OA 体外模型的诱导剂。本研究采用 SD 新生大鼠,从中分离并培养软骨细胞,探究 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用及相关机制。

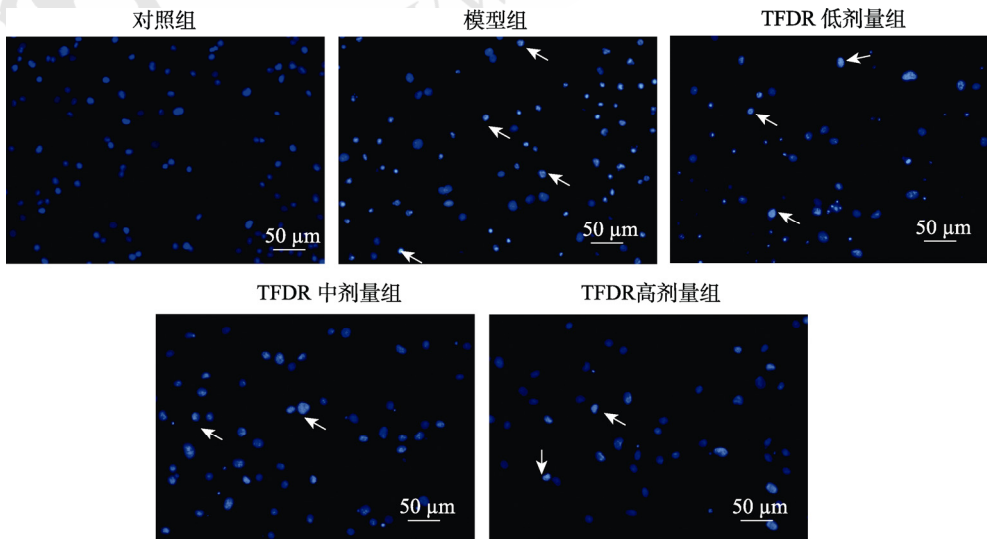


图 3 不同浓度的 TFDR 对软骨细胞凋亡的影响

箭头处细胞发生明显凋亡。

Fig. 3 Effects of different concentrations of TFDR on apoptosis of chondrocytes
Apoptosis was observed at the arrowhead.

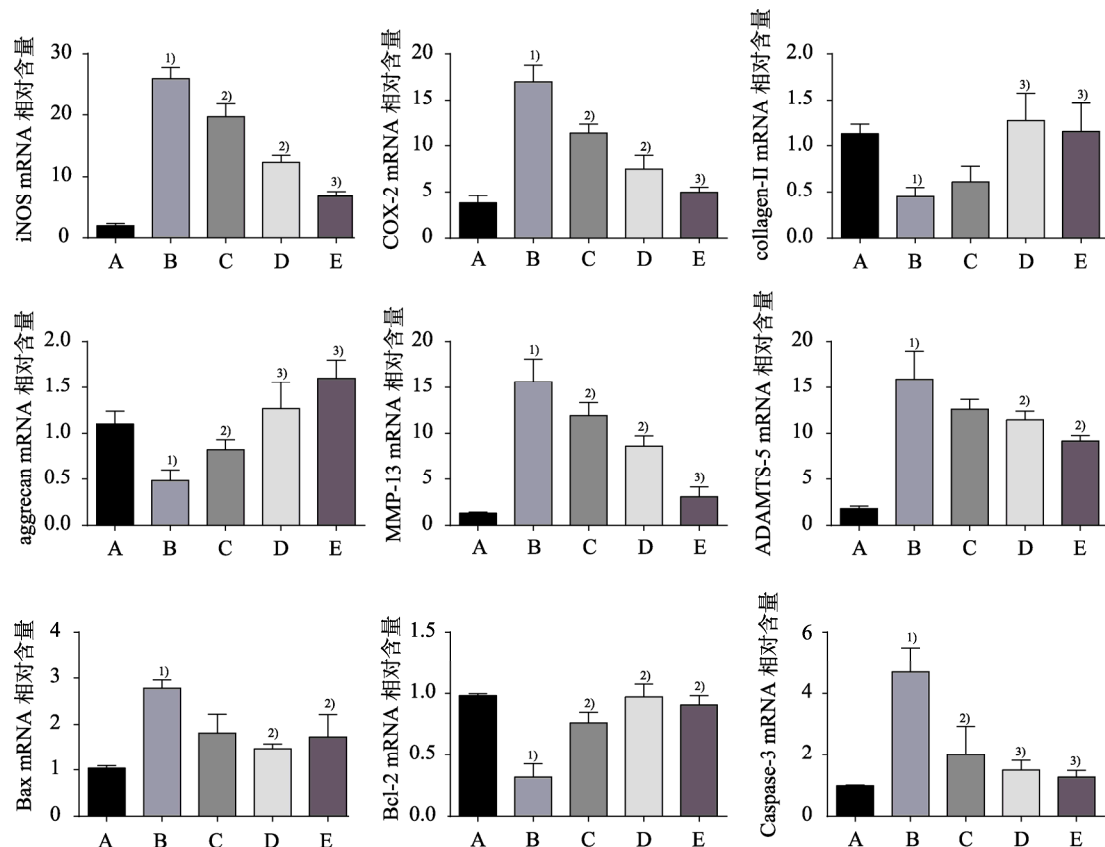


图4 不同浓度 TFDR 对软骨细胞相关基因表达的影响

A-对照组; B-模型组; C-TFDR 低剂量组; D-TFDR 中剂量组; E-TFDR 高剂量组; 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of different concentrations of TFDR on expression of chondrocyte related gene

A-control group; B-model group; C-low dose group of TFDR; D-medium dose group of TFDR; E-high dose group of TFDR; compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

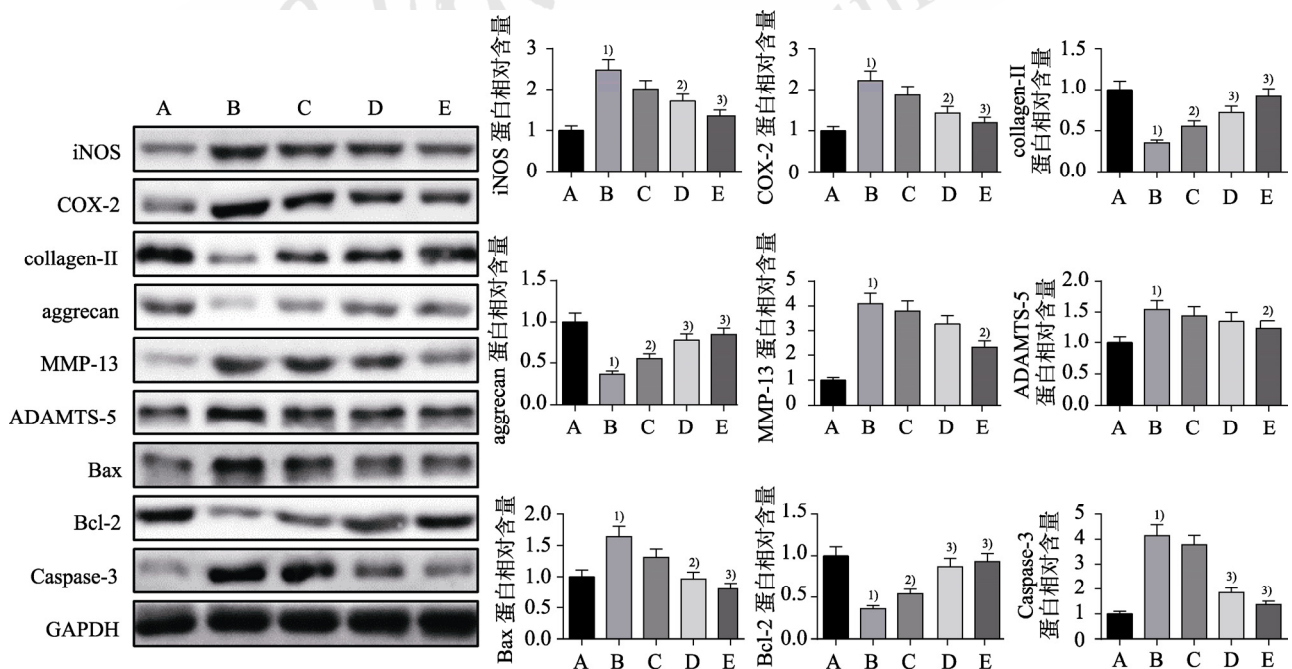


图5 不同浓度 TFDR 对软骨细胞相关蛋白表达的影响

A-对照组; B-模型组; C-TFDR 低剂量组; D-TFDR 中剂量组; E-TFDR 高剂量组; 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effects of different concentrations of TFDR on expression of chondrocyte related proteins

A-control group; B-model group; C-low dose group of TFDR; D-medium dose group of TFDR; E-high dose group of TFDR; compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

本研究首先采用 CCK8 法探究不同浓度的 TFDR 对软骨细胞增殖活性的影响,结果表明,不同浓度的 TFDR 对软骨细胞的增殖有不同程度的促进作用,其中 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g·L⁻¹ 3 个剂量组对软骨细胞的增殖促进作用较强,因此选用这 3 个剂量作为后续的实验剂量。进一步通过 CCK8 法表明,IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖活性明显受到抑制,而经 TFDR 干预后,软骨细胞的增殖活性显著增加。该结果证明了 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞具有一定的保护作用。

炎症反应在 OA 的发生与发展中扮演着重要的角色,TNF- α 、IL-6、PGE2、NO 是其中重要的几个炎症因子,能够有效反映机体的炎症水平^[14]。本实验通过 ELISA 法检测软骨细胞 TNF- α 、IL-6、PGE2、NO 表达情况,结果显示,IL-1 β 诱导的软骨细胞中 TNF- α 、IL-6、PGE2、NO 炎症因子的表达量均增加,而在 TFDR 作用下,这些炎症因子表达均被抑制,该结果表明 TFDR 在一定程度上可以抑制炎症的产生,从而起到保护作用。另一方面,软骨细胞的凋亡在 OA 关节软骨降解中起十分关键的作用^[15],Bax 和 Bcl-2 是与细胞凋亡有密切关系的 2 个基因,有文献证实,中药骨碎补能通过调控促进 Bax 蛋白,抑制 Bcl-2 蛋白^[16],同时抑制凋亡执行因子 Caspase-3^[17],从而起到抑制软骨细胞凋亡的作用。本研究通过 Hoechst 试验表明,TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡具有明显的抑制作用,并通过 qRT-PCR 和 Western blotting 试验进一步从分子和蛋白的角度证实了该结果。

COX-2 是一种环氧化酶,在受到细胞外各种因素刺激时,其合成与表达增强,COX-2 与炎症性疾病的关系非常密切^[18]。生物活性分子 NO 是骨性关节炎发病过程中的重要炎症介质,是由一氧化氮合成酶(NOS)与 L-精氨酸共同作用产生,NOS 又分为结构型(cNOS)和诱导型(iNOS),其中 iNOS 在关节软骨中具有重要的作用^[19]。II 型胶原(collagen-II)和可聚蛋白多糖(aggrecan)是关节软骨中的重要因子,常被用来评价关节软骨的损伤程度^[20]。另外,关节软骨主要由细胞外基质和软骨细胞组成,正常情况下,关节软骨基质的分解代谢与合成维持着动态平衡,这一过程受体内多种分子调控,其中 MMPs 蛋白超家族能降解关节软骨基质,MMP-13 和 ADAMTS-5 在炎症性骨性关节炎疾病中扮演重要角色^[21]。本研究通过 qRT-PCR

和 Western blotting 证实了 TFDR 能够有效抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞中的 iNOS、COX-2、MMP-13、ADAMTS-5 在 mRNA 和蛋白水平的表达,促进 collagen-II、aggrecan mRNA 和蛋白水平的表达。上述实验从分子和蛋白的角度进一步证实 TFDR 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤具有一定的保护作用。

REFERENCES

- [1] DENG C C, JU Z B. The progress of Effective components in traditional Chinese medicine treatment research of osteoarthritis[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2012, 24(2): 97-100.
- [2] 陈禾凤, 杨婉花. 骨头关节炎症慢作用药物及软骨保护药的研究进展[J]. 医药导报 2014, 33(5): 645-649.
- [3] HU N Q, HOU J Y, LIU J X, et al. Study on osteoarthritis mechanisms of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus based on network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(10): 1157-1165.
- [4] 杜良. 健脾软肝方对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠肝窦基底膜形成的干预作用[D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.
- [5] ZENG Z K, HUANG F, LI Y, et al. Effects of flavones of Rhizoma Drynariae on expressions of angiogenic factors in rat masquelet-induced membrane[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2019, 37(10): 2345-2348, 2565-2567.
- [6] ZHAO G, HE G L, LU C Y, et al. Immunoregulation effect of Rhizoma Drynariae flavonoids on immunosuppressive mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28(3): 438-445.
- [7] ZHANG S, TAI D X. A review on knee joint osteoarthritis[J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2016, 8(25): 146-148.
- [8] 李雯燕, 周谋望. 体外冲击波影响骨关节炎关节软骨的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(10): 1156-1158.
- [9] 白雯, 吕素飞, 陶庆文, 等. 中医药对实验动物骨关节炎组织形态学影响的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(10): 1469-1472.
- [10] QING Y P. Pathogenic factors of osteoarthritis of knee joint: The effect of osteoporosis[D]. Qingdao: Qingdao University, 2019.
- [11] MA H N, WEI S H, TAN L Y. Research progress of Rhizoma Drynariae[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2017, 26(9): 59-65, 71.
- [12] LI D X, CHEN Y Y, LUO J, et al. Research progress of total flavonoids of Rhizoma Drynariae intervening the mechanism of osteoarthritis[J]. Rheum Arthritis(风湿病与关节炎), 2019, 8(3): 66-69.
- [13] LIU H X, YIN H B, WANG H N. Research progression of interleukin-1 in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. China J Orthop Traumatol(中国骨伤), 2012, 25(2): 175-178.
- [14] GUO L M, LYU J L, ZHANG L B. Research progress on anti-inflammatory mechanism of natural sesquiterpenoids[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(20): 3989-3999.

- [15] YUAN W, BIAN Y Y, ZHU H J, et al. Curcumin inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of rat chondrocytes via mitochondria-dependent pathway[J]. Chin J Gen Pract(中华全科医学), 2019, 17(4): 528-532.
- [16] JIN L F, HAN Y. Experiment research on effect of *Drynaria* on rabbit knee osteoarthritis chondrocyte apoptosis[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2013, 15(11): 42-46.
- [17] JIN L F. Experiment study on influence of Rhizoma Drynariae on cartilage cell apoptosis of rats with osteoarthritis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31(7): 1699-1703.
- [18] XIE L Z, XIE H G, CHEN C H, et al. Inhibiting the PI3K/AKT/NF- κ B signal pathway with nobiletin for attenuating the development of osteoarthritis: *In vitro* and *in vivo* studies[J]. Food Funct, 2019, 10(4): 2161-2175.
- [19] 刘建伟. 川皮苷在人骨关节炎软骨细胞中抑制炎症介质的表达和调节 JNK/ERK/p38 MAPK 以及 PI3K/Akt 信号通路[D]. 广州: 南方医科大学, 2017.
- [20] WANG W F. The effect and corresponding molecular mechanisms of celastrol in osteoarthritis[D]. Jinan: Shandong University, 2019.
- [21] 李云泽, 赵序利. 骨性关节炎发病机制研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(10): 728-733.
- 收稿日期: 2020-09-25
(本文责编: 曹粤锋)