

牛蒡子苷元对体外培养软骨细胞Ⅱ型胶原表达的影响

陈世宣^{1,2} 冯伟^{1,3△} 卢远坚¹ 李安琪¹ 张增乔¹ 刘益杰¹ 曹彦俊¹

[摘要] 目的:探讨牛蒡子苷元(Arctigenin, ARC-G)对软骨细胞的增殖,及对Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ, Col Ⅱ)、Y 染色体性别决定相关高泳动蛋白盒基因 9(SRY-related high mobility group-box gene 9, SOX9)和基质金属蛋白酶-13(Matrix Metalloproteinase-13, MMP-13)表达的影响。方法:体外分离培养软骨细胞,取第 1 代细胞进行实验干预。实验分为空白组(ARC-0 组)、低浓度牛蒡子苷元组(ARC-L 组)和高浓度牛蒡子苷元组(ARC-H 组)。各组分别予相应干预措施处理 48 h 后,以 SABC 免疫细胞化学染色法观察 Col Ⅱ 的表达情况;以 CCK-8 法检测软骨细胞的增殖情况;以 Real-time quantitative PCR 检测 Col Ⅱ, SOX9 及 MMP-13 mRNA 的表达情况;以酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清液中 Col Ⅱ 的含量。结果:1)ARC-L 组和 ARC-H 组的 Col Ⅱ 阳性染色强度均强于 ARC-0 组,其中 ARC-H 组染色最强;2)与 ARC-0 组相比,在不同时间点 ARC-L 组和 ARC-H 组均可促进软骨细胞的增殖,且 ARC-H 组促增殖作用更显著,除 24 h 和 96 h 的 ARC-L 组外其余各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$);3)与 ARC-0 组相比,ARC-L 组和 ARC-H 组均可上调 Col Ⅱ 和 SOX9 mRNA 的表达,下调 MMP-13 mRNA 的表达,且 ARC-H 组作用更为显著,除 ARC-L 组 Col Ⅱ 及 MMP-13 mRNA 外,差异均有统计学意义($P < 0.05$);4)与 ARC-0 组相比,ARC-L 组和 ARC-H 组均可促进 Col Ⅱ 蛋白的表达,且 ARC-H 组作用更为显著,除 ARC-0 组和 ARC-L 组外,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:牛蒡子苷元可通过上调 SOX9 和 Col Ⅱ mRNA 的表达,下调 MMP-13 mRNA 的表达以促进 Col Ⅱ 蛋白的合成。

[关键词] 膝骨性关节炎;软骨细胞;牛蒡子苷元;Ⅱ型胶原;基质金属蛋白酶-13

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)10-0006-05

Expression of Collagen Ⅱ mRNA for Arctigenin on Chondrocytes In Vitro

CHEN Shixuan^{1,2} FENG Wei^{1,3△} LU Yuanjian¹ LI Anqi¹
ZHANG Zengqiao¹ LIU Yijie¹ CAO Yanjun¹

¹Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

²Wenzhou City Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wenzhou 325000, Zhejiang China;

³Shanghai 7th People's Hospital, Shanghai 200137, China.

Abstract Objective: To detect the effect of arctigenin on chondrocytes proliferation, and on expression of Collagen Ⅱ, SRY-related highmobility group-box gene 9(SOX 9), and matrix metalloproteainase-13(MMP-13)mRNA. **Methods:** Chon-

drocytes were isolated and then cultured in vitro, the first generation of chondrocytes were used for experimental intervention. The chondrocytes were divided into blank group (ARC-0 group), low concentration of arctigenin group(ARC-L group), and high concentration of arctigenin group(ARC-H group). The chondrocytes in each group were respectively treated for 48 h by the corresponding intervention methods, then the expression of Col Ⅱ was observed by immunocytochemistry SABC method. The chondrocytes proliferation was detected by Cell counting kit-8(CCK8) method. The expres-

基金项目:上海市自然科学基金资助项目(15ZR1441000)

上海市卫生和计划生育委员会中医药科研课题
(2016LP037)

上海市浦东新区卫计委卫生科技资助项目
(PW2014A-20)

¹ 上海中医药大学(上海, 201203)

² 温州市中西医结合医院(温州, 325000)

³ 上海市第七人民医院(上海, 200137)

△通信作者 E-mail:fwginger@126.com

sion of Col II, SOX 9, and MMP-13 mRNA were detected by real-time quantitative PCR. And the collagen II content of supernatants was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** 1) The positive staining potency of ARC-L group and ARC-H group were stronger than ARC-0 group, and ARC-H group was the strongest one. 2) The ARC-L group and the ARC-H group could promote chondrocytes proliferation at different point of time compared with ARC-0 group, and the ARC-H group was more significantly, the optical density were significantly different at other all-time points except the 24 h and 96 h point ($P < 0.05$). 3) Compared with ARC-0 group, both of the ARC-L group and the ARC-H group were able to up-regulate the expression of Col II and SOX9 mRNA, and down-regulate the expression MMP-13 mRNA, and the ARC-H group was more significantly. There was significantly different ($P < 0.05$) expected expression of Col II and MMP-13 mRNA in ARC-L group. 4) Compared with ARC-0 group, the content of collagen II in both ARC-L group and ARC-H group were upregulated, and ARC-H group was more significantly. Expect for ARC-0 group and ARC-L group, the difference among other group was significantly different ($P < 0.05$). **Conclusion:** Arctigenin can promote the protein expression of Col II by up-regulating the expression of Col II and SOX 9 mRNA, and down-regulating the expression of MMP-13 mRNA.

Keywords: knee osteoarthritis; chondrocyte; arctigenin; collagen II; matrix metalloproteinases-13

膝骨性关节炎 (Knee Osteoarthritis, KOA) 是一种中老年人常见的慢性退行性骨关节病, 关节软骨的退变是其发生发展的核心环节^[1]。II 型胶原是鉴定软骨细胞的特定蛋白, SOX9 作为其上游基因, 参与 Col II 的特异性表达调节^[2]。MMP-13 是目前已知降解 Col II 最强的蛋白酶, 且在 KOA 患者关节软骨中的表达水平明显高于正常人^[3]。石氏伤科认为 KOA 主要病机为痰湿阻络, 牛蒡子汤是石氏伤科治疗痰湿阻络型 KOA 的经验方, 而牛蒡子苷元是其君药牛蒡子中的主要活性成分。本研究采用牛蒡子苷元干预体外培养的软骨细胞, 并观察其对 Col II, SOX9 和 MMP-13 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级新生 24 h 内 Sprague Dawley 大鼠 3 只, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 实验动物许可证号 SCXK(沪)2013-0016。

1.2 实验试剂

改良型 RPMI-1640 培养基, 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清、D-Hanks 液、0.25% 胰蛋白酶, 购于美国 Gibco 公司; II 型胶原抗体, 购于英国 abcam 公司; SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒和 Mayor 苏木素, 购于武汉博士德生物工程有限公司; TRIZOL, 购于美国 Life 公司; PrimeScript™ RT 试剂盒和 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒, 购于日本 Takara 公司; Cell Counting Kit-8 试剂盒, 购于日本同仁公司; II 型胶原 ELISA 试剂盒, 购于武汉华美生物工程有限公司。

1.3 实验药物

牛蒡子苷元 (纯度 > 99%), 购于上海江莱生物科技有限公司。

1.4 实验仪器

SW-CJ-1FD 型超净台, 上海博迅实业有限公司医

疗设备厂; HF151CO₂ 型培养箱, 上海力申科学仪器有限公司; 3K15 型低温高速台式离心机, 美国 Sigma 公司; PTC-200 型基因扩增仪, 美国 BIO-RAD 公司; 7500fast 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

1.5 实验方法

1.5.1 软骨细胞的分离与培养 软骨细胞的分离与培养参考先期实验方法^[4], 简要步骤如下: 无菌条件下分离关节软骨, 用刀片将其切成大小约 1 mm³ 的骨碎片, 转移至 15 mL 离心管中; 加入 0.25% 胰蛋白酶约 5 mL, 37 °C 水浴锅中消化 60 min, 1 000 r/min 离心 4 min, 弃上清; 加入 0.2% II 型胶原酶约 5 mL, 37 °C 水浴锅中消化 120 min, 1 000 r/min 离心 4 min, 弃上清; 加入 10 mL 含 10% 胎牛血清的培养液重悬, 200 目筛网过滤并收集细胞悬液, 置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 72 h 更换培养液 1 次。

1.5.2 实验分组和干预 实验分为 3 组: 空白组 (ARC-0 组)、低浓度牛蒡子苷元组 (ARC-L 组)、高浓度牛蒡子苷元组 (ARC-H 组)。ARC-L 组和 ARC-H 组分别加入牛蒡子苷元终浓度为 0.1 μmol/L 和 10 μmol/L 的培养液, 而 ARC-0 组仅加入培养液。培养液均含 10% 胎牛血清、1% 双抗和 89% RPMI-1640 培养基。96 孔板和 6 孔板加入培养液的量分别为 200 μL 和 2 mL。

1.6 检测指标与方法

1.6.1 II 胶原免疫细胞化学染色 将无菌圆形玻片 (直径约 14 mm) 置于 6 孔板中, 每组 2 块, 将第 1 代软骨细胞以 3 × 10⁴ / 块接种于玻片上; 细胞隔夜贴壁后按 1.5.2 节方法进行实验干预; 48 h 后弃上清, PBS 洗涤 2 次; 各孔加入 4% 多聚甲醛溶液 2 mL, 室温固定 30 min; 弃上清, PBS 洗 3 次; 将 30% H₂O₂ 和双蒸水以 1:10 比例充分混合, 每孔加 2 mL, 室温下灭活内源性过氧化物酶 10 min, PBS 洗 3 次; 各孔加 2 mL 枸橼酸盐缓冲液, 置于微波炉中火加热至沸腾后断电, 冷

却 10 min 后重复 1 次,甩去液体,PBS 洗 2 遍并甩干;每块玻片滴加 150 μ L 5% BSA 封闭液,4 $^{\circ}$ C 下封闭 20 min,弃液体,晾干不洗;每块玻片滴加 200 μ L II 型胶原一抗,4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,PBS 洗 3 次,每次 2 min;每块玻片滴加 150 μ L 生物素化二抗,室温孵育 20 min,PBS 洗涤 4 次,每次 5 min;每块玻片滴加 150 μ L DAB 显示剂,室温显色 15 min,镜下观察显色情况,PBS 洗 3 次;滴加苏木素复染 5 s,PBS 洗 3 次;95%和 100%乙醇各脱水 2 次,每次 10 s,中性树胶封片,倒置相差显微镜下拍照。

1.6.2 软骨细胞增殖 将生长状态良好的第 1 代软骨细胞按 6×10^3 /孔接种于 96 孔板,每组设 3 复孔,隔夜贴壁后弃上清,按 1.5.2 节方案进行干预,每 48 h 换液 1 次;分别干预 24,48,72 和 96 h 后吸弃培养液,将 CCK8 母液与无血清培养基按 1:9 比例混合,之后各孔均加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光环境下孵育 2 h,采用酶标仪检测 490 nm 下各孔吸光度值。

1.6.3 Real-time quantitative PCR 检测 将第 1 代软骨细胞按 1.8×10^5 /孔接种于 6 孔板中,按 1.5.2 节

方案进行实验干预;48 h 后弃上清,用预冷的 PBS 洗 2 次,各孔加入 1 mL TRIZOL 反复吹打几次使细胞充分裂解,收集细胞裂解液至 1.5 mL EP 管中;每个样品中加入 0.2 mL 氯仿,盖紧瓶盖,剧烈振荡 15 s,室温放置 5 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min;小心吸取上层水相转移至干净无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中;加等体积异丙醇混匀后室温孵育 10 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,加入 1 mL 75% 乙醇清洗沉淀,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 5 min;小心吸弃乙醇,室温空气中干燥 5 min;加入无 RNA 酶的去离子水 15 μ L,反复吹打数次,使沉淀完全溶解;采用紫外吸收法测定 RNA 纯度;严格按照 Takara 逆转录试剂盒构建 20 μ L 反应体系,37 $^{\circ}$ C 中逆转录反应 15 min,85 $^{\circ}$ C 中反应 5 s 使逆转录反应失活;采用 Primer3.0 设计引物,引物序列见表 1。以 GAPDH 作为内参,按照 Takara 试剂盒说明构建 20 μ L 反应体系,95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,共 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火和延伸 30 s,共 40 个循环。测得各组 Ct 值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 ColII,SOX9 和 MMP-13 mRNA 的表达。

表 1 Real-time quantitative PCR 引物名称及序列

基因名称	上游引物(Forward primer)	下游引物(Rreverse primer)
Col II	5'-AGGGCAACAGCAGGTTTCAC-3'	5'-GCCCTATGTCCACACCAAATTC-3'
SOX9	5'-GAAAGACCACCCCGATTACAAG-3'	5'-AAGATGGCGTTAGGAGAGATGTG-3'
MMP-13	5'-GATGATGAAACCTGGACAAGCA-3'	5'-GAACGTCATCATCTGGGAGCA-3'
GAPDH	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

1.6.4 ELISA 检测 将第 1 代软骨细胞按 1.8×10^5 /孔接种于 6 孔板中,按 1.5.2 节方案进行实验干预;48 h 后吸取细胞培养上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.7 统计学方法

实验数据采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 描述,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 Col II 免疫细胞化学染色

如图 1 所示,各组软骨细胞胞浆均可见明显棕黄色的 II 型胶原阳性染色,其中 ARC-L 组(图 1B)和 ARC-H 组(图 1C)的阳性染色强度均强于 ARC-0 组(图 1A),且 ARC-H 组阳性染色强度明显高于 ARC-0 组和 ARC-L 组。

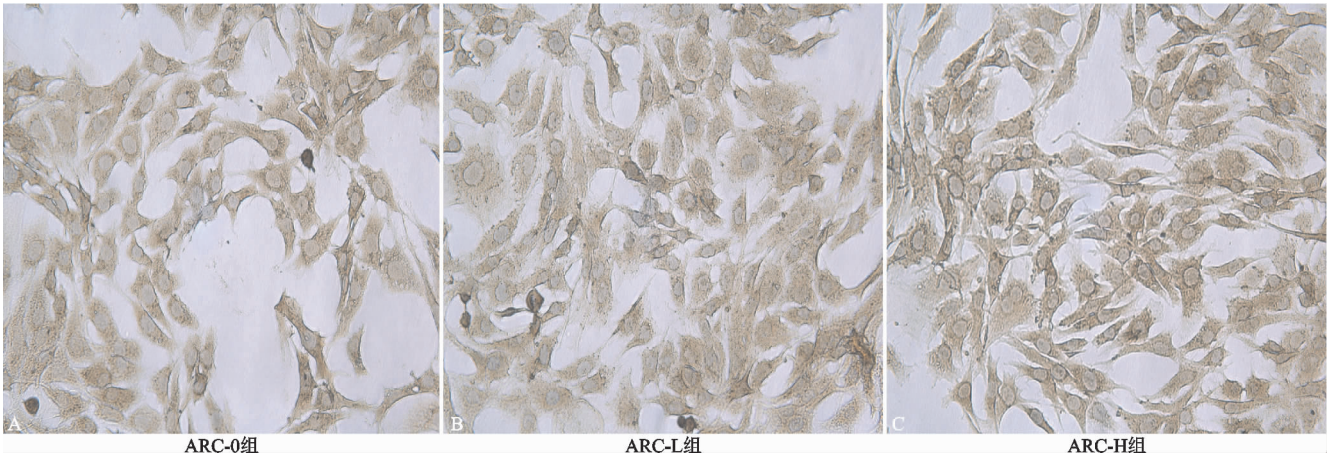


图 1 各组 II 型胶原表达情况(40 \times)

2.2 软骨细胞增殖检测

采用 CCK-8 法检测不同时间点牛蒡子苷元对软骨细胞的增殖情况。与 ARC-0 组相比,ARC-L 组和 ARC-H 组在不同时间点均有促进软骨细胞增殖的作用,除

ARC-L 组 24 h 和 96 h 外,其余各时间点的吸光度值差异均有统计学意义($P<0.05$);与 ARC-L 组相比,随着时间的延长 ARC-H 组表现出显著的促进软骨细胞增殖作用,且差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组软骨细胞增殖比较($\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
ARC-0 组	0.25±0.01	0.31±0.01	0.43±0.01	0.55±0.02
ARC-L 组	0.27±0.02	0.38±0.06 ¹⁾	0.46±0.01 ¹⁾	0.57±0.02
ARC-H 组	0.31±0.01 ¹⁾	0.59±0.02 ¹⁾²⁾	0.69±0.02 ¹⁾²⁾	1.79±0.04 ¹⁾²⁾
F	14.36	371.26	400.68	2873.53

注:1)与同一时间点 ARC-0 组比较,ARC-L 组 24 h 至 96 h 的 P 值分别为 0.10,<0.01,0.01,0.29;ARC-H 组 24 h 至 96 h 的 P 值均<0.01;2)与同一时间点 ARC-L 组比较,ARC-H 组 24 h 至 96 h 的 P 值均<0.01。

2.3 Real-time quantitative PCR 检测

与 ARC-0 组相比,ARC-L 组和 ARC-H 组均可上调 Col II 和 SOX9 mRNA 的表达,下调 MMP-13 mRNA 的表达,且 ARC-H 组作用更为显著,除 ARC-L 组的 Col II 及 MMP-13 mRNA 外,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组 Col II ,SOX9 和 MMP-13mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Col II	SOX9	MMP-13
ARC-0 组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
ARC-L 组	1.29±0.03	1.39±0.09 ¹⁾	0.98±0.01
ARC-H 组	3.57±0.28 ¹⁾²⁾	2.55±0.04 ¹⁾²⁾	0.38±0.02 ¹⁾²⁾
F	154.15	400.09	1453.90

注:与 ARC-0 组比较,ARC-L 组 Col II ,SOX9 和 MMP-13 的 P 值分别为 0.16,0.04,0.15;ARC-H 组 Col II ,SOX9 和 MMP-13 的 P 值均为<0.01;与 ARC-L 组比较,ARC-H 组 Col II ,SOX9 和 MMP-13 的 P 值均为<0.01。

2.4 ELISA 法检测细胞培养上清中 Col II 含量

与 ARC-0 组相比,ARC-L 组和 ARC-H 组的细胞培养上清液中 II 型胶原含量均有所增加,其中 ARC-H 组差异有统计学意义($P<0.05$);与 ARC-L 组相比,ARC-H 组促进 II 型胶原表达的作用更显著,且差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 各组细胞培养上清中 Col II 含量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Col II (ng/L)
ARC-0 组	40.64±0.72
ARC-L 组	41.11±2.16
ARC-H 组	52.40±2.00 ¹⁾²⁾
F	40.65

注:与 ARC-0 组比较,ARC-L 组和 ARC-H 组的 P 值分别为 0.786和<0.01;与 ARC-L 比较,ARC-H 组的 P 值为<0.01。

3 讨论

KOA 是一种慢性退行性骨关节病,也是引起中老年患者疼痛和致残的主要因素。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞类型,Col II 是关节软骨细胞表达的特异性蛋白,其合成减少和降解加速被认为是 KOA 发生

发展的重要环节^[5]。研究表明,富含高浓度的 Col II 环境可更好的维持软骨细胞表型的稳定,使软骨细胞表现出更佳的细胞形态,并更好的诱导间充质干细胞向成软骨分化。此外,大量的 Col II 蛋白构成纤细而致密 Col II 网架结构,发挥着吸收和分散压力、维持软骨组织抗压应力的作用。因此,促进软骨细胞 Col II 蛋白的表达在延缓 KOA 疾病进程中具有极其重要的意义。SOX9 是软骨细胞增殖和分化的“主调控因子”,其单个等位基因突变后会导致严重的关节软骨发育异常^[6-8]。研究表明,KOA 早期 SOX9 会出现反应性的表达上调,但随着疾病的发展 SOX9 基因和蛋白的表达出现显著性下调,且该现象与 KOA 发展过程中 Col II 的含量变化趋势一致,因而认为 SOX9 在调控软骨细胞的表型稳定中不可或缺^[9]。MMP-13 是影响关节软骨细胞外基质代谢平衡的重要蛋白酶,它可下调 Col II 和蛋白聚糖的合成,上调炎症相关因子的表达及活力^[10]。MMP-13 是已知降解 Col II 最强的蛋白酶,在正常的关节软骨中具有较低的表达,但在具有关节软骨破坏的 KOA 中晚期呈现高表达性^[7,11]。Little 等^[12]报道,当敲除 KOA 模型鼠的 MMP-13 基因后,关节软骨的破坏程度明显降低,因而说明 MMP-13 在 KOA 疾病进程中发挥极大的破坏作用。

石氏伤科是享誉上海的中医骨伤科流派,认为 KOA 以积劳或过劳为因,气脉闭塞凝滞,津液输布受限,聚而成痰湿。牛蒡子汤是石氏伤科在长期的 KOA 临床诊治过程中总结的经验方,方中牛蒡子具有祛痰化湿,通行十二经络,利腰膝凝滞之气以滑利关节之功效,为君药。牛蒡子苷元是牛蒡子的主要活性成分,本研究采用牛蒡子苷元干预体外培养的软骨细胞,结果显示:1)ARC-L 组和 ARC-H 组在不同时间点均有促进软骨细胞增殖的作用,且随着时间的延长 ARC-H 组明显优于 ARC-L 组。2)Col II 免疫细胞化学染色、Real-time quantitative PCR 和 ELISA 检测结果趋势一致,即 ARC-H 组可显著促进软骨细胞中 Col II

mRNA 和蛋白的表达,而 ARC-L 组作用并不明显。此外,ARC-H 组还可上调 SOX9 mRNA 的表达,同时下调 MMP-13 mRNA 的表达。因此,牛蒡子苷元可通过调节 SOX9 和 MMP-13 的表达促进软骨细胞的增殖分化以及增加 Col II 的含量,从而较好地维持软骨细胞表型的稳定。但是,牛蒡子苷元防治关节软骨退变的具体分子机制目前并不清楚。Zhang 等^[13]报道,KOA 早期 SOX9 反应性的表达上调可促进细胞外基质中 Col II 和蛋白聚糖的合成,并可抑制 ADAMTS-4,5,7,12 的表达,从而有效地防治关节软骨退变。MMP-13 作为降解细胞外基质重要的蛋白酶,本研究中牛蒡子苷元抑制其 mRNA 的表达是否也是通过上调 SOX9 的合成而实现的,有待今后作进一步深入研究。此外,牛蒡子苷元还具有抗炎活性^[14,15],而 KOA 实际上又是一种炎症性疾病,多种炎症因子在其疾病进程中发挥重要的作用^[16],那么牛蒡子苷元是否同样能够有效地抑制软骨退变过程中炎症因子的过度表达,进而发挥其良好的抗炎作用,这也是未来值得探讨研究的问题之一。总之,牛蒡子苷元防治关节软骨退变的机制可能涉及多靶点、多环节,今后若能清楚地认识它的具体分子机制将为其开发成高效、廉价的骨关节炎药物提供广阔的前景,同时也将为阐释牛蒡子汤防治 KOA 的科学内涵提供理论依据。

参考文献

- [1] 龚志贤,卢敏,罗凌威,等.跌打通痹膏对兔膝关节软骨细胞 MMP-1,MMP-3,MMP-1 及 COL-Ⅱ 的 mRNA 表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(9):1-4.
- [2] Davies SR,Chang LW,Patra D,et al. Computational identification and functional validation of regulatory motifs in cartilage-expressed genes[J]. Genome Res,2007,17(10):1438-1447.
- [3] Chen WP,Xiong Y,Shi YX,et al. Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase expression in human chondrocytes[J]. Int Immunopharmacol,2014,19(1):174-177.
- [4] 陈世宣,冯伟,周一心,等.牛蒡子苷元对关节软骨细胞增殖及Ⅱ型胶原表达的影响[J].上海中医药杂志,2015,49(7):72-74.
- [5] 杜国庆,丁道芳,李玲慧,等.不同浓度的 Chir99021 对软骨细胞增殖和Ⅱ型胶原表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(2):1-5.
- [6] Gordon CT,Tan TY,Benko S,et al. Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease[J]. J Med Genet,2009,46(10):649-656.
- [7] Roach HI,Yamada N,Cheung KS,et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions[J]. Arthritis Rheum,2005,52(10):3110-3124.
- [8] 张兴德,张彩琴,刘启迪,等.牛蒡子抗肿瘤活性成分及作用机制研究进展[J].中国现代中药,2012,14(12):12-17.
- [9] 王璐,赵烽,刘珂.牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展[J].中草药,2008,39(3):467-470.
- [10] Shen J,Chen D. Recent progress in osteoarthritis research [J]. J Am Acad Orthop Surg,2014,22(7):467-468.
- [11] Wang M,Sampson ER,Jin H,et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther,2013,15(1):R5.
- [12] Little CB,Barai A,Burkhardt D,et al. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development[J]. Arthritis Rheum,2009,60(12):3723-3733.
- [13] Zhang Q, Ji Q, Wang X, et al. SOX9 is a regulator of ADAMTS-induced cartilage degeneration at the early stage of human osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015,23(12):2259-2268.
- [14] Zhao F,Wang L,Liu K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L, through inhibition on iNOS pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 122(3):457-462.
- [15] Wu X,Dou Y,Yang Y,et al. Arctigenin exerts anti-colitis efficacy through inhibiting the differentiation of Th1 and Th17 cells via an mTORC1-dependent pathway[J]. Biochem Pharmacol,2015,96(4):323-336.
- [16] 郭伟雄,魏波.炎症细胞因子及通路在骨关节炎中的研究进展[J].国际检验医学杂志,2015,36(15):2240-2241.

(收稿日期:2017-04-08)