

基于网络药理学和分子对接研究牛膝-杜仲药对治疗膝骨关节炎的作用机制

张涛¹, 马书杰², 叶斌³, 严隽陶^{1*}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 2. 上海市第二康复医院, 上海 201900; 3. 上海市第三康复医院, 上海 200070)

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接研究牛膝-杜仲药对治疗膝骨关节炎的关键靶点蛋白的作用机制。**方法** 使用 TC MSP 平台查找牛膝-杜仲药对的活性成分并预测作用靶点, 筛选 GeneCards、OMIM 数据库中有关膝骨关节炎的相关基因并进行合并。通过 STRING 在线数据库将疾病与药物交集靶点进行蛋白相互作用分析, Cytoscape 3.7.2 软件中 NetworkAnalyzer 插件对蛋白互作网络进行拓扑学分析, 根据度值选定关键靶点。利用 DAVID 数据库对潜在靶点进行 GO 分析, 探寻药对治疗膝骨关节炎的生物功能, 通过 KEGG 通路富集分析探究药对治疗膝骨关节炎的主要信号通路。在 Cytoscape 软件中构建“药物-活性成分-靶点-通路”调控网络, 根据度值选定核心药物活性成分。使用 AutoDockTools 等软件, 对药物关键分子与疾病关键蛋白进行分子对接验证。**结果** 牛膝-杜仲药对作用靶点共 234 个, 膝骨关节炎相关蛋白靶点共 3 090 个, 药物-疾病交集靶蛋白共 132 个。AKT1、IL6、TP53、VEGFA、TNF、JUN、MMP9、EGF、PTGS2、CASP3 等蛋白为药对治疗膝骨关节炎的主要作用靶点, 主要参与 TNF、HIF-1、破骨细胞分化、TLR、细胞凋亡、NLR 等信号通路, 主要围绕 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、缺氧的反应、炎症反应、对细胞增殖凋亡调控等生物学进程发挥治疗作用。靶点基因主要在细胞外基质、线粒体、核浆、胞质等处发挥作用, 参与的分子功能主要包括蛋白、蛋白激酶、以及转录因子的结合等。有 5 种主要活性成分与 5 种关键靶点蛋白对接, 均具有较强的结合活性。**结论** 牛膝-杜仲药对可能通过多种活性成分同时调控靶点基因及相关信号通路, 发挥调控细胞凋亡、软骨基质降解、炎症反应以及骨重塑的作用, 从而延缓膝骨关节炎的进展。

关键词: 牛膝-杜仲药对; 膝骨关节炎; 作用机制; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2369-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.055

膝骨关节炎是以膝关节周围关节软骨退变和继发性骨反应为特征的关节疾病, 在 60 岁以上的老年人中致残率超过 20%^[1], 不仅会影响患者的身心健康, 还增加了医疗系统和社会的经济成本^[2]。目前, 临床常用的短期对症治疗药物主要为非甾体类抗炎药, 但其心血管风险、上消化道刺激、出血等不良反应明显^[3]。研究证实, 中医药在膝骨关节炎的防治中具有较好的疗效, 而且不良反应相对较少, 临床应用广泛^[4]。

中医理论中将膝骨关节炎归属为“骨痹”“膝痹”范畴, 其发病多因年老体衰、肝肾亏虚而致筋骨失于濡养, 或因风寒湿热之邪流注肌肉、筋骨、关节而致经络痹阻, 气血运行不畅, 肢体筋脉拘急而发病。牛膝与杜仲皆入肝、肾经, 均可补肝肾、强筋骨, 前者还可逐瘀通经, 后者还

能祛除关节湿邪, 二药合用可补益肝肾以治本, 化痰化湿以治标。现代研究也显示, 牛膝-杜仲药对是膝骨关节炎治疗中使用频率最高的药对之一^[5], 但迄今为止尚无该药对治疗膝骨关节炎的相关机制考察。因此, 本研究采用网络药理学预测牛膝-杜仲药对治疗膝骨关节炎的潜在作用靶点和信号通路, 并结合分子对接技术进行验证, 以期系统地揭示药物与疾病间的关系, 并为相关临床应用和机制研究提供新的证据和思路。

1 材料和方法

1.1 数据库、软件及分析平台 详见表 1。

1.2 活性成分及其作用靶点筛选 使用中药系统药理学数据库及分析平台 (TC MSP) 筛选牛膝-杜仲药对活性成分, 以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药

收稿日期: 2021-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81603713); 上海市医学重点专科建设项目 (ZK2019C02); 静安区中医临床重点专科建设项目 (JA2020-Z009)

作者简介: 张涛 (1992—), 男, 博士生, 研究方向为推拿及其相关疾病。Tel: 17862967372, E-mail: 510444994@qq.com

* 通信作者: 严隽陶 (1942—), 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为推拿及其相关疾病。E-mail: doctoryjt@126.com

网络出版日期: 2021-08-11

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210811.1135.002.html>

表1 数据库、软件及分析平台

名称	网址	版本号
中药系统数据库及分析平台(TCMSP)	https://tcmssp.com/tcmsspsearch.php	2.3
Uniprot	https://www.uniprot.org	—
GeneCards 数据库	https://www.genecards.org	—
OMIM 数据库	https://omim.org	—
R 语言	https://www.r-project.org	4.04
STRING 在线分析平台	https://string-db.org	—
BMK Cloud 平台	https://international.biocloud.net	—
Cytoscape 软件	https://cytoscape.org	3.7.2
DAVID 在线分析平台	https://david.ncifcrf.gov	6.8
PDB 数据库	http://www1.rcsb.org	—
PyMOL 软件	www.pymol.org	2.2.0
AutoDockTools 软件	http://autodock.scripps.edu/wiki/AutoDockTools	1.5.6
AutoDock Vina 程序	http://vina.scripps.edu	1.1.2

性 (drug like, DL) ≥ 0.18 为筛选条件, 将筛选出的活性成分与其潜在作用靶点进行配对, 通过 Uniprot 数据库转换出作用靶点的通用基因名称, 未被转换的靶点使用手动检索, 最后去除重复基因, 即为活性成分作用靶点。

1.3 膝关节炎疾病靶点预测 以“knee osteoarthritis”为搜索词, 在 GeneCard、OMIM 数据库中搜索人类膝关节炎的相关基因, 合并去除重复项后获得膝关节炎相关靶点。

1.4 药物-疾病交集靶点基因数据库构建 使用在线 BMK Cloud 平台, 将牛膝-杜仲药对药物活性成分作用基因与膝关节炎基因取交集, 并绘制交集基因的维恩图。

1.5 药物-疾病交集靶点蛋白互作网络构建 在 STRING 数据库中进行交集靶点的蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析, 使用 Cytoscape 中的“Network analyzer”插件, 通过拓扑学分析计算出 PPI 网络各靶点节点的度值 (Degree), 根据节点度值大小选定网络中关键靶点基因, 度值越大, 该基因在 PPI 网络中的作用越大。

1.6 GO、KEGG 富集分析 利用 DAVID 数据库对核心靶点进行基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析, 探寻牛膝-杜仲药对治疗膝关节炎的生物功能。通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 探究牛膝-杜仲药对治疗膝关节炎的主要信号通路, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

1.7 “药物-活性成分-靶点-通路”拓补网络构建 使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建牛膝-杜仲药对与膝关节炎交集靶点的“药物-活性成分-靶点-通路”调控网络, “Network analyzer”插件进行网络拓扑参数分析得出上述网络中节点的度值, 根据度值大小确定重要活性成分和靶点。

1.8 活性成分与靶点蛋白的分子对接验证 从 PDB 数据库下载关键靶点蛋白 3D 结构, 从 TCMSP 平台下载主要活性成分 mol2 文件, 然后使用 PyMOL 软件对关键靶点蛋白进行去水、加氢等操作, 通过 AutoDockTools 1.5.6、AutoDock Vina 软件进行分子对接, 记录结合能。

2 结果

2.1 活性成分及作用靶点 牛膝-杜仲药对活性成分共 323 种, 其中牛膝 176 种, 杜仲 147 种, 按照口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 进行筛选后, 最终确定牛膝活性成分 17 种, 杜仲活性成分 21 种, 见表 2。同时, 筛选出牛膝-杜仲药对作用靶点共 234 个。

2.2 膝关节炎疾病靶点预测 合并 GeneCards、OMIM 数据库中有关膝关节炎的基因, 去除重复项, 获得疾病相关基因靶点 3 090 个。

2.3 药物-疾病交集靶点基因数据库构建 使用在线 BMK Cloud 平台, 获得牛膝-杜仲药对与膝关节炎的药物-疾病交集靶点基因共 132 个, 见图 1。

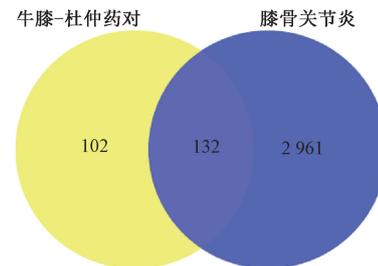


图1 药物-疾病交集靶点基因韦恩图

2.4 药物-疾病交集靶点蛋白互作网络构建 通过 STRING 数据库将 132 个交集靶点以最低要求互动得分 0.7 为筛选参数分析, 最终得出 778 条边和 132 个节点。采用 Cytoscape 软件构建“活性成分-靶点”蛋白互作网络, Network Analyzer 工具分析网络中节点的度值, 节点大小和颜色深浅反映度值大小, 根据其排序确定核心靶点 (图 2), 度值排名前 10 的蛋白见表 3, 可知这些靶点在 PPI 网络中起着关键的作用, 即为牛膝-杜仲药对有效成分调控膝关节炎的关键靶点。

2.5 GO、KEGG 富集分析 将 132 个交集靶点基因上传到 DAVID 在线数据库进行 GO 富集分析, 得到具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的 GO 条目共 749 条, 其中生物学进程 (biological process, BP) 585 条, 细胞组分 (cellular component, CC) 62 条, 分子功能 (molecular function, MF) 102 条, 靶点基因主要参与 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、对缺氧的反应、炎症反应、对细胞增殖、凋亡的调控等生物学进程等; 主要在细胞外基质、线粒体、核浆、胞质等细胞组分处发挥作用, 参与的分子功能主要包括蛋白、蛋白激酶、以及转录因子的结合等。图 3 展示了每个模块 P 值最小的前 10 个条目, 其值越小, 颜色越偏向红色, 反之则偏向蓝色; 点的大小表示富集的基因数。KEGG 分析显示, 靶点基因富集了 108 条相关通路, 图 4 列出了 P 值排序最小的 20 个条目。另外, 靶点基因主要涉及 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、破骨细胞分化、Toll 样受体信号通路、细胞凋亡以及 Nod 样受体通路等, 与细胞的凋亡、增殖、分化、转化以及氧化应激、炎症反应等密切相关。

表2 牛膝-杜仲活性成分

编码	分子名称	OB/%	DL	归属
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	牛膝
MOL001006	poriferasta-7,22E-dien-3beta-ol	42.98	0.76	牛膝
MOL012461	28-norolean-17-en-3-ol	35.93	0.78	牛膝
MOL012505	bidentatoside II _qt	31.76	0.59	牛膝
MOL012537	spinoside A	41.75	0.40	牛膝
MOL012542	β -ecdysterone	44.23	0.82	牛膝
MOL001454	berberine	36.86	0.78	牛膝
MOL001458	coptisine	30.67	0.86	牛膝
MOL000173	wogonin	30.68	0.23	牛膝
MOL002643	delta 7-stigmastanol	37.42	0.75	牛膝
MOL002714	baicalein	33.52	0.21	牛膝
MOL002776	baicalin	40.12	0.75	牛膝
MOL002897	epiberberine	43.09	0.78	牛膝
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75	牛膝、杜仲
MOL003847	inophyllum E	38.81	0.85	牛膝
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	牛膝、杜仲
MOL004355	spinasterol	42.98	0.76	牛膝
MOL000449	stigmastanol	43.83	0.76	牛膝
MOL002058	40957-99-1	57.20	0.62	杜仲
MOL004367	olivil	62.23	0.41	杜仲
MOL000443	erythraline	49.18	0.55	杜仲
MOL006709	AIDS214634	92.43	0.55	杜仲
MOL007059	3- β -hydroxymethylenetanshiquinone	32.16	0.41	杜仲
MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24	杜仲
MOL007563	yangambin	57.53	0.81	杜仲
MOL009009	(+)-medioresinol	87.19	0.62	杜仲
MOL009015	(-)-tabernemontanine	58.67	0.61	杜仲
MOL009027	cyclopamine	55.42	0.82	杜仲
MOL009029	dehydrodiconiferyl alcohol 4 γ '-di-O- β -D-glucopyranoside_qt	51.44	0.40	杜仲
MOL009031	cinchonon-9-al, 6'-methoxy-, (9R)-	68.22	0.40	杜仲
MOL009047	(+)-eudesmin	33.29	0.62	杜仲
MOL009053	4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol	50.76	0.39	杜仲
MOL009055	hirsutin_qt	49.81	0.37	杜仲
MOL002773	β -carotene	37.18	0.58	杜仲
MOL008240	(E)-3-[4-[(1R,2R)-2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1-methylol-ethoxy]-3-methoxy-phenyl]acrolein	56.32	0.36	杜仲
MOL011604	syringetin	36.82	0.37	杜仲

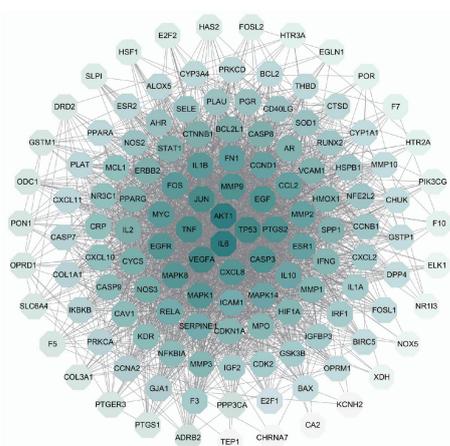


图2 药物-疾病靶点基因蛋白相互作用网络

2.6 药物-活性成分-靶点-通路调控网络构建 图5 (颜色

越深,度值越大)显示,度值排名前5位的化合物分别是MOL000098(槲皮素)、MOL000422(山柰酚)、MOL000173(汉黄芩素)、MOL002714(黄芩素)、MOL002773(β -胡萝卜素)。

2.7 活性成分与靶点蛋白的分子对接 选择疾病-活性成分-靶点-通路调控网络及PPI网络分析结果度值排名前5的活性成分,与靶点基因进行分子对接验证,使用AutoDock软件进行结合能力预测,构象越稳定,结合能越低,通常结合能<0 kcal/mol提示分子之间具有结合活性,<-5.0 kcal/mol提示分子之间具有较强的结合活性^[6]。将5种活性成分与5个靶蛋白对接后,发现槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、 β -胡萝卜素与AKT1、IL6、TP53、VEGFA、TNF均有较好的结合能力,见表4。再采用PyMOL软件对靶点蛋白与成分对接的最佳构象进行可视化分析,直观展示其构象关系,以槲皮素为例,见图6。

表3 药物-疾病核心靶点基因

基因	全称	度值	中心度
AKT1	AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT serine/threonine kinase 1)	101	0.059 316
IL6	白介素 6(interleukin-6)	101	0.053 962
TP53	肿瘤蛋白 P53(tumor protein P53)	93	0.034 191
VEGFA	血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor A)	92	0.025 596
TNF	肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)	91	0.025 648
JUN	Jun 原癌基因,AP-1 转录因子亚基(Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit)	89	0.027 579
MMP9	基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9)	83	0.020 403
EGF	表皮生长因子(epidermal Growth Factor)	82	0.028 278
PTGS2	前列腺素 G/H 合成酶 2(prostaglandin G/H synthase 2)	82	0.014 408
CASP3	胱天蛋白酶 3(caspase 3)	82	0.012 660

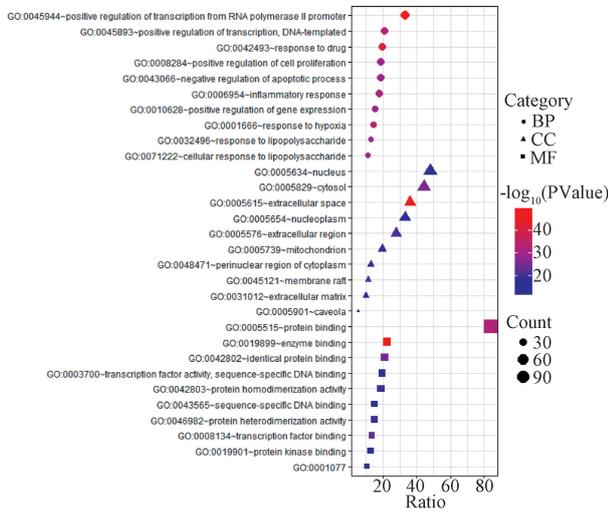


图3 GO 富集分析气泡图

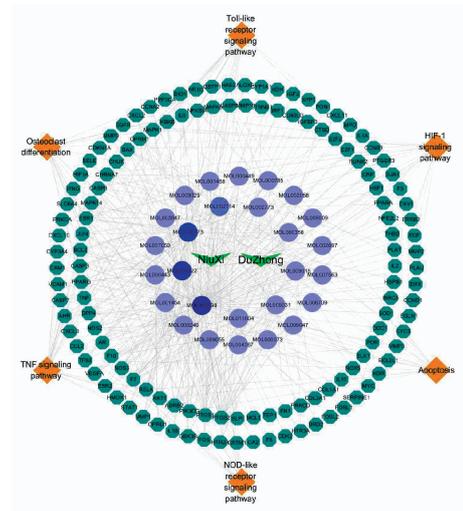


图5 药物-活性成分-靶点-通路调控网络

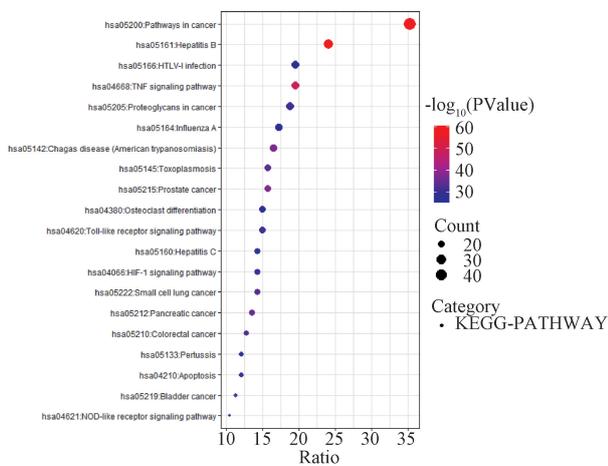


图4 KEGG 富集分析气泡图

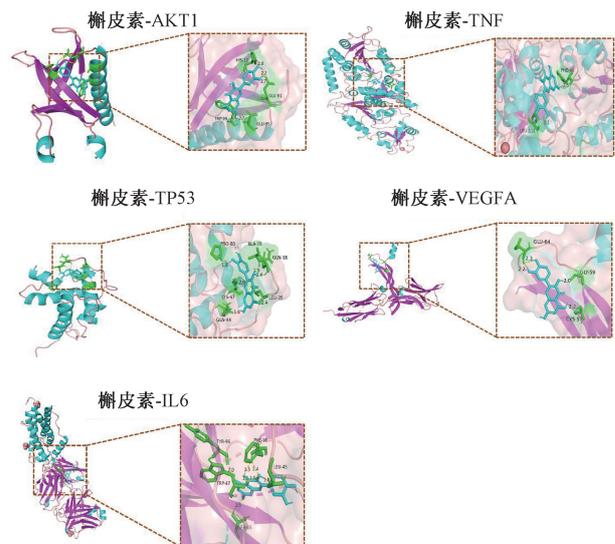


图6 槲皮素与核心靶点基因的分子对接

表 4 药物-疾病核心靶点基因

活性成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	AKT1	IL6	TP53	VEGFA	TNF
槲皮素	-4.90	-5.68	-5.54	-3.93	-4.34
汉黄芩素	-3.98	-6.08	-4.14	-4.81	-4.69
β-胡萝卜素	-5.69	-7.21	-5.18	-5.87	-6.95
山柰酚	-3.85	-4.92	-5.84	-5.42	-5.20
黄芩素	-4.38	-5.93	-5.30	-5.50	-5.67

3 讨论

本研究采用网络药理学探究了牛膝-杜仲药对治疗膝骨关节炎的现代分子生物学以及药理学机制。结果显示,牛膝-杜仲药对治疗膝骨关节炎的潜在靶点共 132 个,核心靶点包括 IL6、TP53、AKT1、VEGFA、MMP9 等,并可能通过参与氧化应激反应、炎症反应、对细胞增殖、凋亡的调控等生物学进程,影响蛋白、酶、转录因子的结合等分子功能^[7]。TP53 便具有抑制 DNA 复制,阻断细胞周期,导致细胞凋亡,加速软骨降解的作用^[8],细胞实验证实牛膝提取物可以在体外抑制大鼠变性软骨细胞中 p53 的表达^[9]。AKT1 是 PI3K 信号通路中重要的下游靶点激酶,其参与的 PI3K/AKT 信号通路是抗软骨细胞凋亡的重要通路^[10]。研究证实促炎因子 IL-6 在膝骨关节炎患者的关节液、滑膜,软骨下骨和软骨中表达升高。IL-6 还可引起基质金属蛋白酶 MMP9 表达的升高,抑制蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的合成,加速细胞外基质的降解,并可通过激活破骨细胞在骨吸收中起关键作用^[11]。VEGFA 同样参与了膝骨关节炎软骨退变和骨赘形成等病理反应^[12],研究显示 VEGFA 可刺激血管内皮细胞分裂进而促进血管的新生,加速膝关节的营养物质的交换以及炎性产物的代谢^[13],促进软骨滑膜细胞的修复,此外 VEGFA 具有加速骨形成同时抑制骨吸收的作用^[14]。

本研究显示,牛膝-杜仲药对治疗膝骨关节炎的有效成分主要为槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素以及 β-胡萝卜素等,这些小分子成分大多具有抗氧化、抗炎以及软骨保护作用。槲皮素是一种具有抗炎、抗氧化作用的多酚类生物黄酮,研究表明其可清除活性氧自由基,改善机体的氧化应激^[15],缓解膝骨关节炎的临床症状,并可减缓大鼠关节炎的发展速度^[16],亦可抑制基质降解蛋白酶和炎性介质的表达,同时促进软骨合成代谢因子的产生,减轻膝关节炎软骨的降解以及软骨细胞的凋亡^[17],而黄芩素、山柰酚与槲皮素作用相似^[18]。汉黄芩素已被证实可通过抑制炎性介质如 IL6、COX-2 等的表达,并降低基质金属蛋白酶如 MMP-13、MMP9 等的表达,发挥其抗炎及软骨保护作用^[19]。β-胡萝卜素可用于治疗多种因衰老引起的退行性疾病,已被证实可通过抑制 NF-κB 信号通路抑制炎症因子的表达^[20]。

牛膝-杜仲药对在治疗膝骨关节炎的靶点蛋白涉及 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、破骨细胞分化、Toll 样受体信号通路等,与软骨细胞的凋亡、分化及氧化应激、炎症反应、骨的重塑与吸收等密切相关。TNF-α 可与膜受体结合,

激活转录因子 NF-κB 和 MAPK 信号通路,增强炎症反应进而诱导基质金属蛋白酶产生,并诱导 IL6 等炎症因子产生,加剧软骨的破坏^[21]。HIF-1 是维持软骨细胞稳态和支持细胞分化的重要因素^[22],研究表明 HIF-1α 可通过抑制 β-catenin 转录活性下调软骨细胞中 MMP13 的表达,从而延缓骨关节炎的疾病进展,缺乏 HIF-1α 则可加速软骨的分解代谢^[23]。Toll 样受体 (TLR) 是跨膜信号转导受体,研究显示,TLRs 在膝骨关节炎软骨细胞中表达上调^[24],TLR1-7 和 TLR9 在关节炎患者的滑膜中上调,而 TLR4 与关节炎的严重程度有关^[25],TLR2/TLR4 信号通路诱导 IL-1 和 MMPs 表达,增加 NO 和 PGE₂ 的产生,加速蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的降解,导致关节软骨破坏,并促进膝骨关节炎的形成^[26-27]。作为骨关节炎的重要治疗靶点,破骨细胞可参与骨吸收以维持骨重塑的动态平衡^[28],已有研究证实骨关节炎的形成与趋化因子诱导的破骨细胞分化异常有关^[29]。分子对接显示,牛膝-杜仲药对关键活性成分与关键靶点蛋白结合时的结合能均小于 0 kcal/mol,提示其结合活性较好,证实了牛膝-杜仲药对治疗膝骨关节炎的靶向作用。

综上所述,牛膝-杜仲药对在膝骨关节炎的治疗中可能涉及不同靶点和通路,并在调控细胞凋亡、软骨基质降解、炎症反应以及骨重塑中发挥治疗作用,延缓膝骨关节炎的进展,体现了中医药治疗膝骨关节炎多靶点、多途径的特点。

参考文献:

- [1] Kolasinski S L, Neogi T, Hochberg M C, et al. 2019 American college of rheumatology/arthritis foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2020, 72(2): 149-162.
- [2] Safiri S, Kolahi A A, Smith E, et al. Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the global burden of disease study 2017 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(6): 819-828.
- [3] Gregori D, Giacobelli G, Minto C, et al. Association of pharmacological treatments with long-term pain control in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Am Med Assoc*, 2018, 320(24): 2564-2579.
- [4] 蔡鑫,唐芳,马武开,等. 中医药治疗膝骨关节炎疗效与安全性的 Meta 分析 [J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(10): 20-24; 36.
- [5] 潘建科,洪坤豪,刘军,等. 基于关联规则和复杂系统熵聚类的膝骨关节炎用药规律研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(12): 201-204.
- [6] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [7] 黄泽灵,何俊君,施珊妮,等. 基于网络药理学分析牛膝-桑寄生药对治疗骨关节炎的作用机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(29): 4599-4604.

- [8] Lin M N, Lin Y H, Li X H, *et al.* Warm sparse-dense wave inhibits cartilage degradation in papain-induced osteoarthritis through the mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 3674-3680.
- [9] Chen Z Y, Wu G W, Zheng R X. A systematic pharmacology and *in vitro* study to identify the role of the active compounds of *Achyranthes bidentata* in the treatment of osteoarthritis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e925545.
- [10] Tong K M, Shieh D C, Chen C P, *et al.* Leptin induces IL-8 expression *via* leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF- κ B/p300 binding in human synovial fibroblasts [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(8): 1478-1488.
- [11] Wang T T, He C Q. Pro-inflammatory cytokines; the link between obesity and osteoarthritis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 38-50.
- [12] Saetan N, Honsawek S, Tanavalee A, *et al.* Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis [J]. *Int Orthop*, 2014, 38(5): 1099-1104.
- [13] 黎永华, 冯 强, 谭仁霆, 等. 杜仲活性成分抗膝关节炎滑膜炎病变分子机制的网络药理学阐述[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(5): 765-771.
- [14] Clarkin C E, Gerstenfeld L C. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? [J]. *Cell Biochem Funct*, 2013, 31(1): 1-11.
- [15] Feng K, Chen Z X, Li P C, *et al.* Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis *via* SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18192-18205.
- [16] Britti D, Crupi R, Impellizzeri D, *et al.* A novel composite formulation of palmitoylethanolamide and quercetin decreases inflammation and relieves pain in inflammatory and osteoarthritic pain models[J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1): 229.
- [17] Hu Y, Gui Z P, Zhou Y N, *et al.* Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 145: 146-160.
- [18] Zhang X D, Zhu Y J, Chen X T, *et al.* Baicalein ameliorates inflammatory-related apoptotic and catabolic phenotypes in human chondrocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(2): 301-308.
- [19] Khan N M, Haseeb A, Ansari M Y, *et al.* Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human osteoarthritis chondrocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 288-301.
- [20] 张晓音, 张珊珊, 吴 旻, 等. β -胡萝卜素对脂多糖刺激巨噬细胞 RAW264. 7 炎症因子的影响及其机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(6): 838-843.
- [21] Roman-Blas J A, Jimenez S A. NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(9): 839-848.
- [22] Gelse K, Pfander D, Obier S, *et al.* Role of hypoxia-inducible factor 1 alpha in the integrity of articular cartilage in murine knee joints [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(5): R111.
- [23] Bouaziz W, Sigaux J, Modrowski D, *et al.* Interaction of HIF1 α and β -catenin inhibits matrix metalloproteinase 13 expression and prevents cartilage damage in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(19): 5453-5458.
- [24] Barreto G, Manninen M, K Eklund K. Osteoarthritis and toll-like receptors: when innate immunity meets chondrocyte apoptosis[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(4): 65.
- [25] Tamaki Y, Takakubo Y, Hirayama T, *et al.* Expression of Toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid synovitis[J]. *J Rheumatol*, 2011, 38(5): 810-820.
- [26] Herrero-Beaumont G, Pérez-Baos S, Sánchez-Pernaute O, *et al.* Targeting chronic innate inflammatory pathways, the main road to prevention of osteoarthritis progression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 24-32.
- [27] Wang P, Zhu F, Tong Z Q, *et al.* Response of chondrocytes to shear stress: antagonistic effects of the binding partners Toll-like receptor 4 and caveolin-1[J]. *FASEB J*, 2011, 25(10): 3401-3415.
- [28] Liu S B, Zhou H, Liu H H, *et al.* Fluorine-contained hydroxyapatite suppresses bone resorption through inhibiting osteoclasts differentiation and function *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(3): e12613.
- [29] Bernardini G, Benigni G, Scivo R, *et al.* The multifunctional role of the chemokine system in arthritogenic processes[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(3): 11.