

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.002

橙皮素抑制 NF- κ B 通路调控软骨细胞炎性退变的实验研究 *

薛 豹 桑伟林 姜亚飞 马金忠[△]

(上海交通大学附属第一人民医院骨科 上海 200080)

摘要 目的:炎症因子所介导的慢性炎症瀑布反应是引起关节软骨退变的主要原因。橙皮素具有抗炎、抗氧化应激等作用,研究橙皮素对关节软骨细胞炎症因子表达及相关信号通路的影响可以加深对关节软骨退变的认识,进而为其预防、治疗提供新的参考依据。研究橙皮素对人关节软骨细胞退变的影响,并从炎症角度来探讨其具体的分子机制。**方法:**体外分离培养人关节软骨细胞,首先采用 CCK-8 方法检测橙皮素对人关节软骨细胞增殖的抑制作用;运用 RT-PCR 和 western blot 研究橙皮素对于脂多糖(LPS)诱发的关节软骨细胞炎症反应和分解代谢的影响,运用 Western blot 研究橙皮素对于 LPS 所诱导的 NF- κ B 信号通路的激活的影响。**结果:**当橙皮素的浓度低于 10 μ M 时,对于人关节软骨细胞的生长没有明显的抑制作用;real-time PCR 和 western blot 结果显示,在 LPS 刺激下,关节软骨细胞中 IL-6, TNF- α , MMP9, MMP13 的基因表达水平明显升高,而橙皮素可以明显抑制炎症反应的激活;Western blot 结果显示在 LPS 的刺激下,NF- κ B 信号通路显著激活,IKB α 降解,随后 P65 磷酸化。而在橙皮素预处理组中,IKB α 降解减少,P65 磷酸化减少,NF- κ B 信号通路的激活受到了明显的抑制。以上结果均有统计学差异($P<0.05$)。**结论:**橙皮素可通过 NF- κ B 信号通路影响人关节软骨细胞炎症反应和分解代谢相关基因的表达,进而降低关节软骨细胞内外的慢性炎症反应,进而延缓老年性关节软骨退变。

关键词:橙皮素;软骨细胞;骨性关节炎;脂多糖

中图分类号:R-33;Q954.657;R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-608-06

Hesperidin Suppress Inflammatory Degeneration of Chondrocyte by Inhibiting NF- κ B Signalling Pathway*

XUE Bao, SANG Wei-lin, JIANG Ya-fei, MA Jin-zhong[△]

(Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: Chronic inflammatory cascade reaction mediated by inflammatory factors is the main cause of chronic degeneration of articular cartilage. Hesperetin has anti-inflammatory, anti oxidative stress effects, to study the effects of hesperetin on the inflammatory reactions and related signaling pathways of chondrocytes can deepen our understanding on the degeneration of the articular cartilage, and its prevention and treatment to provide new reference. To study the effect of hesperidin on degeneration of human chondrocytes and explore its specific molecular mechanism in terms of inflammation. **Methods:** We first detection of inhibitory effect of hesperetin on chondrocytes proliferation by CCK-8 assay; We study the effects of hesperetin on the inflammation and metabolism induced by lipopolysaccharide (LPS) in chondrocytes using RT-PCR and western blot. And we detected the activation of NF- κ B signal pathway induced by LPS using western blot. **Results:** Hesperidin inhibited cell viability in a dose-dependent manner, and up to 10 μ M, this compound had no significant cytotoxic effects on the human chondrocytes. Real-time PCR showed that LPS increased the expression of IL-6, TNF- α , MMP9 and MMP13 genes at the transcriptional level, while pre-treatment with hesperidin reversed this process in a concentration-dependent manner; Western blot further support the results of RT-PCR. Western blot results showed that NF- κ B signaling pathway was activated in the stimulation of LPS, IKB α degradation, and then phosphorylation of P65, while pretreatment with hesperetin abolished this effects. The above results were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Hesperitin can inhibit the expression of inflammatory and catabolism genes, and then reduce the chronic inflammation of chondrocytes, thus delaying the degeneration of articular cartilage.

Key words: Hesperitin; Chondrocyte; Osteoarthritis; Lipopolysaccharide

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q954.657; R684.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)04-608-06

前言

骨性关节炎是一种复杂性状疾病,多种关键性因素在 OA 发病过程的多个环节发挥重要作用^[1]。OA 曾被认为是由于力

* 基金项目:上海市科委基金资助项目(13411950503)

作者简介:薛豹,硕士研究生,研究方向:软骨退变,E-mail: 729906869@qq.com

[△] 通讯作者:马金忠,主任医师,研究方向:老年骨关节病,E-mail: majinzhong1963@sina.com

(收稿日期:2018-05-28 接受日期:2018-06-23)

学因素导致的仅仅局限于关节软骨的病变,但随着认识的深入,OA 发病机制被慢慢揭示,现认为 OA 病变累及整个关节,属于器官性疾病^[23]。活跃的分解代谢和关节无菌性炎症在其中扮演者重要的角色。以关节软骨进行性破坏,软骨下骨增生硬化,关节局部炎症反应为主要特征,炎症细胞释放炎症因子及分解代谢酶降解关节软骨组织^[45],炎症因子引起的炎症瀑布反应加重关节损伤,促进血管入侵、滑膜增生、纤维化,晚期引起关节僵硬、活动受限、畸形^[67]。因而研究如何延缓关节软骨的退变有利于延缓骨性关节炎的进展,进而提高生活质量。

橙皮素(Hesperitin)是一类天然黄酮类化合物,广泛存在于植物源性物质中^[8-10]。研究表明,橙皮素具有抗氧化、抗炎、抗衰老等一系列要用功能,具有很好的药用价值^[12-17]。本实验旨在研究橙皮素对于软骨细胞的氧化炎症反应的影响,同时探究橙皮素对于软骨细胞内炎症相关信号通路的影响。以研究其在延缓软骨细胞炎性退变中的潜在药用价值。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

橙皮素(上海源叶生物),脂多糖(上海翊圣生物),DMEM/F12 培养基(Hyclone),胎牛血清(sigma),0.2%胰酶(gibco),II 型胶原酶(solarbio),Cell Counting Kit-8 (CCK-8;Dojindo),RIPA 裂解液,蛋白定量检测试剂盒,SDS 配胶试剂盒(碧云天),ECL 发光液(密理博),TriZol 裂解液(Invitrogen),MMP9,MMP13 抗体(CST),GAPDH 抗体(sigma),鼠源兔源二抗(艾必信),PrimeScriptTMRT Master Mix 和 SYBR[®] Fast qPCR Mix (TAKARA)等。

1.2 关节软骨细胞提取

取成人膝关节骨性关节炎患者手术标本,无菌条件下将组织用 DMEM/F12 培养基洗涤三次去除血迹,肉眼下用眼科剪剔除软组织和骨,保留软骨组织。用无菌眼科剪将组织剪碎成 $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ 大小,于 0.2%胰酶中置于 37°C 温箱消化 30 min,然后改用 1%的 II 型胶原酶于 37°C 温箱中消化 2 h,期间每隔 5 min 震荡一次,然后离心去上清,再将细胞重悬于含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中,于 37°C ,体积分数为 5%的恒温培养箱中培养,每隔 2 天换液一次。当细胞融合成 80-90%时,消化传代。

1.3 CCK8 检测橙皮素对软骨细胞增殖的抑制作用

收集对数生长期的软骨细胞,计数,按照 5000 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,加入不同浓度的橙皮素(2, 4, 6, 8, 10 μM)继续培养 24 小时后,每孔加入 cck8 检测试剂 10 μL ,于 37°C 培养箱中孵育 2 小时,用酶标仪检测 450 nm 时每孔吸光度大小。

1.4 细胞分组及处理

实验共分 4 组,第一组设为空白对照组;第二组以脂多糖(1 $\mu\text{g/mL}$)刺激;第三组先以 4 μM 橙皮素预处理 2 小时,再加脂多糖(1 $\mu\text{g/mL}$)刺激 24 小时;第四组先以 8 μM 橙皮素预处理 2 小时,再加脂多糖(1 $\mu\text{g/mL}$)刺激 24 小时。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测炎症因子和基质金属蛋白酶基因表达

细胞处理 24 小时,吸掉培养基,用预冷的冰 PBS 洗一遍,

TriZol 法提取出细胞总 RNA,NanoDrop 检测 RNA 的浓度及纯度均符合实验要求。取 1 ng RNA 反转成 cDNA,三复孔行实时荧光定量 PCR,检测 IL-6, TNF- α , MMP9, MMP13 的基因表达水平, β -Actin 作为内参基因,运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析各组细胞基因表达情况,引物序列如表 1 所示。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time PCR studies

基因名称 Gene	引物序列 Primer sequence
IL-6	Forward: AACCTTCCAAAGATGGCTGAA
	Reverse: CCTCAAACCTCCAAAAGACCAGTG
TNF- α	Forward: TCTTCTCGAACCCCGAGTGA
	Reverse: CCTCTGATGGCACCACCAG
MMP9	Forward: AGTCCACCTTGTGCTCTTCCC
	Reverse: TCTGCCACCCGAGTGTAAACCAT
MMP13	Forward: CTTCACGATGGCATTGCTGAC
	Reverse: CGCCATGCTCCTTAATTCCA
β -Actin	Forward: CCGTGAAAAGATGACCCAGATC
	Reverse: CACAGCCTGGATGGCTACGT

1.6 Western blot 检测基质金属蛋白酶表达和 NF-KB 信号通路激活情况

细胞处理后,吸尽培养基,用预冷的冰 PBS 洗一遍,RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测各组蛋白浓度,后行 SDS-PAGE 电泳,转膜,脱脂牛奶封闭后, 4°C 摇床上一抗(MMP9, MMP13, P-I κ B α , 总 I κ B α , P-P65 及总 P65)孵育过夜。第二日 PBS-T 洗三次,每次 10 分钟,室温下孵育二抗 1 小时,PBS-T 洗三次,每次 10 分钟,ECL 发光液显影。蛋白条带用 Image J 行灰度统计。

1.7 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析,所有数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,组件采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 人关节软骨细胞细胞的观察

细胞 12 小时开始贴壁,后逐渐长出角呈多角形态,光镜下可见细胞形态呈多角行。

2.2 橙皮素对于软骨细胞增殖的抑制作用

橙皮素的药物毒性很低^[18-20]。在不同浓度的橙皮素的处理组中,细胞的增殖受到轻度的抑制。如图 1 所示,当橙皮素浓度低于 10 μM 时,该化合物对于软骨细胞的增殖无明显的抑制作用,与对照组(0 μM)相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。故本课题选择了 4 和 8 μM 两个浓度来进行后续实验。

2.3 橙皮素对于软骨细胞炎症因子和基质金属蛋白酶表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示,软骨细胞经 1 $\mu\text{g/mL}$ 的脂多糖刺激后,IL-6, TNF- α , MMP9, MMP13 表达水平较对照组(空白对照)显著上调,差异有统计学差异($P < 0.05$)。而在加入

脂多糖之前用橙皮素(4 μM 和 8 μM)预处理 2 小时的实验组中,IL-6, TNF- α , MMP9, MMP13 的表达水平较单纯脂多糖处理组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2A)。此外,我们运用 western blot 技术检测了四组细胞中的 MMP9 和 MMP13 的蛋白表达水平,发现在单纯脂多糖刺激条件下,软骨细胞中的 MMP9 和 MMP13 蛋白表达水平显著升高,而在橙皮素预处理实验组中,MMP9 和 MMP13 的表达水平较单纯脂多糖刺激组明显下调,我们对 western blot 条带进行了灰度统计,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2B)。这一结果进一步验证了实时荧光定量 PCR 的结果。

2.4 橙皮素抑制软骨细胞 NF- κB 信号通路的激活

在这一组实验中,我们运用 western blot 检测了 NF- κB 信号通路的激活水平。Western blot 实验中我们将细胞接种于 6 cm 培养皿中,第二组用脂多糖刺激 30 分钟,而第三、第四组在脂多糖刺激之前分别予以不同浓度的橙皮素(4 和 8 μM)预处理 2 小时,脂多糖刺激 30 分钟后,吸尽培养基,PBS 洗一遍,提取蛋白行 western blot 检测(图 3)。结果表明,在单脂多糖刺激组中,NF- κB 信号通路显著激活,P-I $\kappa\text{B}\alpha$ 和 P-P65 水平显著上

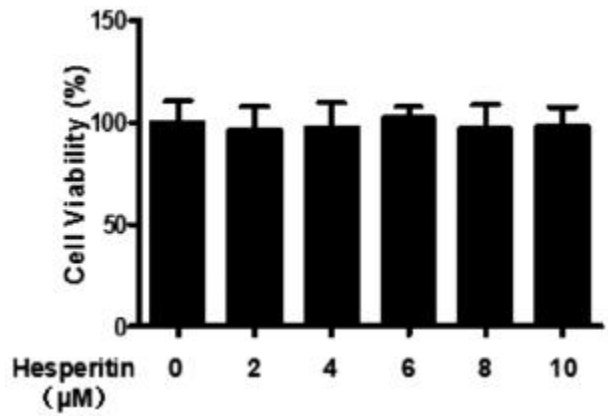


图 1 橙皮素对软骨细胞增殖的影响

Fig.1 The effects of hesperetin on chondrocytes proliferation

升,而总 I $\kappa\text{B}\alpha$ 因降解而减少。而在以橙皮素预处理的实验组中,P-I $\kappa\text{B}\alpha$ 和 P-P65 水平较单纯脂多糖刺激组降低,I $\kappa\text{B}\alpha$ 降解减弱,P65 磷酸化减少。我们对 western blot 条带进行了灰度统计,差异有统计学意义($P<0.05$)。

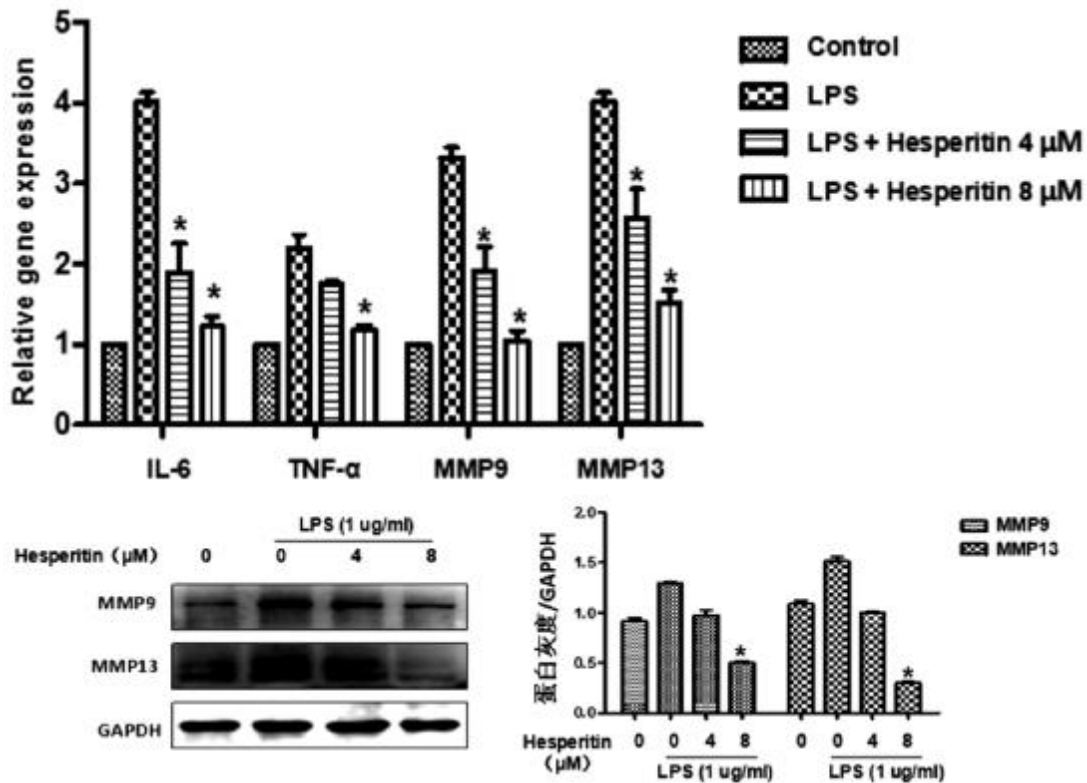


图 2 橙皮素抑制炎症因子和分解酶的表达

Fig.2 The effects of hesperetin on the expression of inflammatory cytokines and catabolism of chondrocytes

3 讨论

骨关节炎(OA)是骨科常见的一种疾病,是滑膜关节以伴有关节周围骨质增生为特点的软骨丧失所致疾病^[21]。美国风湿病协会(ARA)将骨关节炎分为原发性和继发性骨关节炎。原发性骨关节炎的病因不是很明确,可能与年龄、性别、职业、体重超重、遗传和关节过度运动等因素有关;继发性骨关节炎可继发于韧带损伤、半月板损伤、涉及关节的骨折、先天性畸形或关

节感染等任何关节损伤^[22]。相关报道显示西方人髋关节骨关节炎的发生率高,而东方人则以膝关节发生率高。骨关节炎主要以关节软骨退变及骨质硬化、增生为主要特征。临床主要表现为进行性发展的关节疼痛、肿胀、僵硬、功能障碍,严重时导致关节畸形,甚至丧失关节功能,影响患者正常工作和生活。长期以来 OA 被认为是一种以关节软骨退变为主的疾病^[23],但是软骨下骨改变在 OA 的发生和发展中的作用,近年来已引起了越来越多学者的注意,软骨下骨的重要性得到了公认。目前,软骨

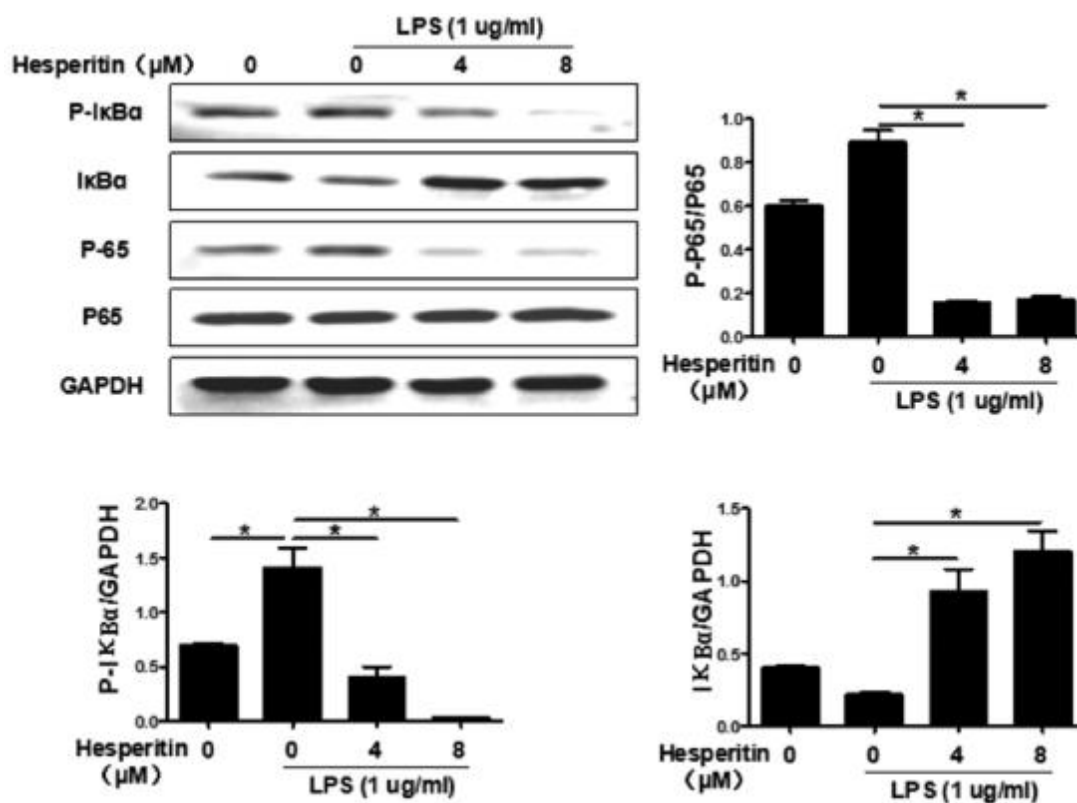


图3 橙皮素抑制 NF-κB 信号通路的激活

Fig.3 The effects of hesperetin on NF-κB signalling pathway.

下骨已被认为是非常有潜力的治疗 OA 的靶点^[24]。因此,了解 OA 软骨下骨的病理改变及其机制,有利于为该病的治疗提供思路。软骨下骨位于软骨下方,一般关节软骨下骨包括软骨下骨板和骨小梁两部分^[25]。软骨下骨板是一层薄薄的皮质层,位于钙化软骨层下方,它具有显著的孔隙,为关节软骨和软骨下骨之间的直接联系提供了途径^[26]。深入研究软骨下骨的结构及其 OA 病变过程中的变化,有利于进一步明确 OA 进程及其发病机制。软骨下骨和关节软骨形成一个紧密的组合功能单位称为“骨软骨结”^[27],作为一个功能整体维持关节内环境的平衡^[28]。软骨下骨的骨小梁在正常的关节中发挥重要的减震和支持性作用,也可能对软骨的营养供应和代谢起重要的作用^[29]。老年骨性关节炎是一种复杂性疾病,多种关键性因素在其发病过程的多个环节发挥重要作用^[30]。由于力学因素、生物因素等导致的关节软骨退行性变是临床关节疼痛肿胀的最常见原因。随着认识的深入,这一疾病的发病机制被慢慢揭示,现认为活跃的分解代谢和无菌性炎症在其中扮演者重要的角色。以关节软骨进行性退变,纤维化,软骨细胞增生,局部炎症反应为主要特征^[31,32]。炎症细胞释放炎症因子及分解代谢酶降解软骨组织和关节周围组织,炎症因子引起的炎症瀑布反应加重关节的损伤和退变,促进血管入侵、纤维化,晚期引起疼痛、僵硬、活动受限等症状^[33,34]。在关节退变的进程中,软骨细胞和炎症细胞分泌的炎症因子如 IL-1β、TNF-α 等可进一步促发炎症反应,同时引起分解因子如 MMP2、MMP9、MMP13 等表达量增加,从而促进基质的降解,诱导软骨细胞凋亡,并最终造成关节退变^[35]。科学的进步日新月异,但迄今为止,关节退变的生物学机制尚未完全清楚,除了晚期病人行关节置换术可以取得较满意效果以外,对于早期患者,目前尚无满意的应用于临床的靶向治疗药物可

以有效延缓关节软骨的退变^[36,37]。只有加强对疾病发病机理的认识,并提高对于疾病的评估效能,并深入开展相关的基础研究,才能在早期对疾病进行及时的干预,以减少患者的痛苦。

NF-κB 是一个极其重要的炎症相关信号通路,主要包括 5 个部分:Rel, RelA (P65), RelB, P50 和 P52。NF-κB 是一种多效性的快反应转录因子,静息状态下, NF-κB 以与 IκB 聚合的三聚体形式或与前体蛋白聚合的二聚体的形式存在于细胞浆中^[38]。当其受氧化应激、细菌脂多糖,细胞因子等多种刺激而活化后, IκB 磷酸化,再在蛋白水解酶作用下发生降解,从而使 NF-κB 得以磷酸化活化而发生核转位,入核的 NF-κB 可以特异性的结合多种基因启动子部位特定结合位点,从而促进下游其转录表达^[39]。研究表明, NF-κB 参与调控前炎症性细胞因子等基因的转录,同时可以参与体液及细胞免疫应答的发生^[40]。

近年来研究表明, NF-κB 信号通路在关节退变性疾病中发挥着重要的作用,各种外界的刺激因素作用在软骨细胞上,激活 NF-κB 信号通路,并启动下游相关基因转录表达,产生炎症瀑布反应,加速分解代谢。这些炎症因子,包括 IL6, TNF-α 等已被证实可以调节细胞外基质的更新,加速软骨细胞的凋亡,加速关节软骨的变性、退变,并最终整个关节的退变^[41]。本研究中观察到,在 LPS 诱导下,软骨细胞的 IL-6, TNF-α, MMP9, MMP13 等均表达上调,而当给予橙皮素预处理时,相应的炎症因子及分解酶的表达受到了一定程度的抑制,同时 western blot 结果进一步验证了行使分解代谢的基质金属蛋白酶表达受到了抑制。相应的炎症相关信号通路的激活受到了抑制,说明橙皮素对于脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应和分解代谢有明显的抑制作用,并有望成为一新的干预关节软骨退变的新的药物。

橙皮素是一类天然黄酮类化合物,广泛存在于水果、花卉、

食品等植物源物质中。主要来源于橙皮苷水解,具有生物和药理活性,广泛应用于有机化学、医学、农学、食品等多个领域。橙皮素的作用主要体现在:抗胆固醇过高、抗高血压、利尿、抗炎、止痛、抗过敏、抗氧化、抗炎、管保护、神经保护作用、抑制膀胱癌变、化学诱导的鼠伤寒沙门菌基因突变。胆固醇在体内有着广泛的生理作用,但如果过量则会导致高胆固醇血症,对机体产生不利影响。现代研究发现,动脉粥样硬化、静脉血栓的形成与高胆固醇血症有密切相关性。Jeong^[42]等用橙皮素合成出一系列橙皮素醚类或酯类衍生物,并通过喂食试验鼠高胆固醇食物(在饲料中添加 0.05%橙皮素醚类或酯类衍生物),以检测其降低胆固醇的效果。结果表明,喂食 10 d 后,连有长碳链的橙皮素醚衍生物 Hesperetin7-O-laurylether 和 Hesperetin7-O-oleylether 可以有效降低试验鼠血浆中总胆固醇的含量。秦得安^[43]等研究了橙皮苷对羟自由基的清除作用和对脂质过氧化的抑制作用,表明橙皮苷对羟自由基有显著的清除作用,且呈剂量依赖关系。同时还对羟基引起的细胞膜脂质过氧化有明显的抑制作用。实验还表明^[44],橙皮苷在体内外均有抗脂质氧化的作用,可以抑制心肌感染和动脉粥样硬化患者的脂质过氧化物的形成。橙皮苷磺酸钠对 1,1-二苯基-2-三硝基苯基(DPPH)自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基、烷基自由基均有不同程度的清除作用;并且在浓度达到 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 清除率达到最高,均达到 90%以上。橙皮苷和橙皮素以及柑橘类果实的提取物均表现一定的抗炎、抗过敏的作用。Fujita^[45]等通过对三硝基氯苯诱导的小鼠接触性皮炎(PC-CD)的研究,柑橘未成熟果实的 50%乙醇提取物(CU-ext)与氢化泼尼松合并给药比分别提取物(CU-ext)单独给药和氢化泼尼松单独给药都有更强的抗过敏作用;橙皮苷和氢化泼尼松合并给药也得到相似的结果。结果表明氢化泼尼松与提取物(CU-ext)或者橙皮苷有协同作用。

综上所述,本研究针对橙皮素对软骨细胞炎症反应和分解代谢的抑制作用进行了初步的研究,并发现橙皮素可以明显抑制软骨细胞内的 NF- κ B 信号通路,并降低软骨细胞 IL-6, TNF- α , MMP9, MMP13 等的表达。由此认为橙皮素对软骨细胞的保护作用是通过抑制 NF- κ B 信号通路降低炎症反应和分解代谢来实现的,这一发现为老年关节退行性病变的基础防治提供了新的参考依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Silawal, J Triebel, T Bertsch, et al. Osteoarthritis and the Complement Cascade[J]. Clinical medicine insights[J]. Arthritis and musculoskeletal disorders, 2018, 11: 1179544117751430
- [2] R F Loeser, S R Goldring, C R Scanzello, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ [J]. Arthritis and rheumatism, 2012, 64: 1697-1707
- [3] T Vaseenon, Y Tochigi, A D Heiner, et al. Organ-level histological and biomechanical responses from localized osteoarticular injury in the rabbit knee [J]. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 2011, 29: 340-346
- [4] J H Park, J Y Hong, K Han, et al. Prevalence of symptomatic hip, knee, and spine osteoarthritis nationwide health survey analysis of an elderly Korean population[J]. Medicine, 2017, 96: e6372
- [5] C C Liu, Y Zhang, B L Dai, et al. Chlorogenic acid prevents inflamma-

- tory responses in IL1 β stimulated human SW1353 chondrocytes, a model for osteoarthritis[J]. Molecular medicine reports, 2017
- [6] M H Li, R Xiao, J B Li, et al. Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis and cartilage, 2017, 25: 1577-1587
- [7] D Yu, J Xu, F Liu, et al. Subchondral bone changes and the impacts on joint pain and articular cartilage degeneration in osteoarthritis [J]. Clinical and experimental rheumatology, 2016, 34: 929-934
- [8] A I Carballo-Villalobos, M E Gonzalez-Trujano, N Alvarado-Vazquez, et al. Pro-inflammatory cytokines involvement in the hesperidin anti-hyperalgesic effects at peripheral and central levels in a neuropathic pain model[J]. Inflammopharmacology, 2017, 25: 265-269
- [9] S A Adefegha, D B Rosa Leal, A A Olabiyi, et al. Hesperidin attenuates inflammation and oxidative damage in pleural exudates and liver of rat model of pleurisy[J]. Redox report: communications in free radical research, 2017: 1-9
- [10] R M Martinez, F A Pinho-Ribeiro, V S Steffen, et al. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage [J]. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 2015, 148: 145-153
- [11] A Jangra, P Kasbe, S N Pandey, et al. Hesperidin and Silibinin Ameliorate Aluminum-Induced Neurotoxicity: Modulation of Antioxidants and Inflammatory Cytokines Level in Mice Hippocampus [J]. Biological trace element research, 2015, 168: 462-471
- [12] Y J Xiong, H W Chu, Y Lin, et al. Hesperidin alleviates rat postoperative ileus through anti-inflammation and stimulation of Ca(2+)-dependent myosin phosphorylation [J]. Acta pharmacologica Sinica, 2016, 37: 1091-1100
- [13] S O Rotimi, G E Bankole, I B Adelani, et al. Hesperidin prevents lipopolysaccharide-induced endotoxicity in rats [J]. Immunopharmacology and immunotoxicology, 2016, 38: 364-371
- [14] M Li, H Shao, X Zhang, et al. Hesperidin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Mice by Promoting the miRNA-132 Pathway[J]. Inflammation, 2016, 39: 1681-1689
- [15] H Parhiz, A Roohbakhsh, F Soltani, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models[J]. Phytotherapy research: PTR, 2015, 29: 323-331
- [16] Y Hong, Z An. Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF-kappaB signaling [J]. Archives of pharmacological research, 2015
- [17] A Ahmadi, A Shadboorestan, S F Nabavi, et al. The Role of Hesperidin in Cell Signal Transduction Pathway for the Prevention or Treatment of Cancer [J]. Current medicinal chemistry, 2015, 22: 3462-3471
- [18] Mahmoud A M, Mohammed H M, Khadrawy S M, et al. Hesperidin protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via modulation of Nrf2/ARE/HO-1, PPAR γ and TGF- β 1/Smad3 signaling, and amelioration of oxidative stress and inflammation [J]. Chemico-biological interactions, 2017, 277: 146
- [19] Chen X, Ding H W, Li H D, et al. Hesperetin derivative-14 alleviates

- inflammation by activating PPAR- γ in mice with CCl₄-induced acute liver injury and LPS-treated RAW264.7 cells [J]. Toxicology Letters, 2017, 274: 51-63
- [20] Ren H, Hao J, Liu T, et al. Hesperetin Suppresses Inflammatory Responses in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264. 7 Cells via the Inhibition of NF- κ B and Activation of Nrf2/HO-1 Pathways [J]. Inflammation, 2016, 39(3): 964-973
- [21] Ceng Q Osteoarthritis [M] . Tianjin: Tianjin science and Technology Press, 1999: 1
- [22] Qiu G. Progress in epidemiology and etiology of osteoarthritis[J]. Continuing medical education, 2005, (7): 68-69
- [23] Park DY, Jin LH, Min BH, et al. Subchondral bone scan uptake correlates with articular cartilage degeneration in osteoarthritic knees[J]. Int J Rheum Dis, 2016, 20(10): 1393-1402
- [24] Castaeda S, Roman-Blas JA, Largo R, et al. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(3): 315-323
- [25] Goldring M, Goldring S. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Ann NY Acad Sci, 2010, 1192 (1): 230-237
- [26] MILZ S, PUTZ R. Quantitativgy of the subchondral plate of the tibial plateau[J]. J Anat, 1994, 185(Pt 1): 103-110
- [27] Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis [J]. Bone, 2012, 51(2): 204-211
- [28] Li G, Yin J, Gao J, et al. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(6): 223
- [29] Deng C, Zhu H, Li J, et al. Bioactive Scaffolds for Regeneration of Cartilage and Subchondral Bone Interface [J]. Theranostics, 2018, 8 (7): 1940
- [30] F Berenbaum, T M Griffin, R Liu-Bryan. Review: Metabolic Regulation of Inflammation in Osteoarthritis [J]. Arthritis&rheumatology, 2017, 699-621
- [31] K Y Chin. The spice for joint inflammation: anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis [J]. Drug design, development and therapy, 2016, 10: 3029-3042
- [32] X Houard, M B Goldring, F Berenbaum. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis [J]. Current rheumatology reports, 2013, 15375
- [33] M Attur, S Krasnokutsky, A Statnikov, et al. Low-grade inflammation in symptomatic knee osteoarthritis: prognostic value of inflammatory plasma lipids and peripheral blood leukocyte biomarkers [J]. Arthritis&rheumatology, 2015, 67: 2905-2915
- [34] M B Goldring, M Otero. Inflammation in osteoarthritis [J]. Current opinion in rheumatology, 2011, 23: 471-478
- [35] Z Zamli, M Sharif. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? [J]. International journal of rheumatic diseases, 2011, 14159-14166
- [36] Y T Gu, J Chen, Z L Meng, et al. Research progress on osteoarthritis treatment mechanisms[J]. Biomedicine&pharmacotherapy =Biomedecine&pharmacotherapie, 2017, 931246-1252
- [37] G Herrero-Beaumont, J A Roman-Blas, O Bruyere, et al. Clinical settings in knee osteoarthritis: Pathophysiology guides treatment[J]. Maturitas, 2017, 9654-9657
- [38] X. F. Wang, A. P. Zhang, Z. Y. Sun, et al. Expression of NF-kappaB in a degenerative human intervertebral disc model [J]. Zhonghua yi xue za zhi, 2017, 97: 1324-1329
- [39] S Wang, C Liu, Z Sun, et al. IL-1beta increases asporin expression via the NF-kappaB p65 pathway in nucleus pulposus cells during intervertebral disc degeneration[J]. Scientific reports, 2017, 74112
- [40] S Rigoglou, A G Papavassiliou. The NF-kappaB signalling pathway in osteoarthritis[J]. The international journal of biochemistry&cell biology, 2013, 45: 2580-2584
- [41] C C Lin, C M Chan, Y P Huang, et al. Methylglyoxal activates NF-kappaB nuclear translocation and induces COX-2 expression via a p38-dependent pathway in synovial cells [J]. Life sciences, 2016, 14925-14933
- [42] Jeong T, Kim E E, Lee C, et al. Hypocholesterolemic Activity of Hesperetin Derivatives [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003, 13(16): 2663-2665
- [43] Cui J, Wu S. Recent advances in breviscapine[J]. Research and development of natural products, 2003, 15(3): 255-258
- [44] Jiang G, Jiang Y, Peng J. hesperidin against LDL oxidation and its effect on MCP-1 mRNA transformation [J]. Journal of Third Military Medical University, 2004, 26(8): 717-719
- [45] Zhao M. Preparation and properties of mifepristone liposomes [J]. China pharmaceutical, 2009, 18 (13): 34-35