

千草方熏洗对膝骨关节炎大鼠软骨的保护作用及相关机制

李宏军, 施源, 何敏, 李坚, 王君君, 邓新超, 鲁密,
张辉, 吴岩, 吴红丽, 梁平
(武汉市第八医院, 湖北武汉 430010)

摘要:【目的】观察千草方熏洗对膝骨关节炎大鼠软骨蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路表达的影响,探讨千草方熏洗对膝骨关节炎大鼠软骨的保护作用及相关机制。【方法】将32只SD大鼠随机分成4组,即正常组、模型组、千草方组和透明质酸组,每组8只。除正常组,其他3组大鼠采用改良Hulth法构建膝骨关节炎模型。制模后,千草方组大鼠给予千草方熏洗,透明质酸组大鼠给予关节腔内注射透明质酸,模型组不给予任何治疗。治疗30 d。给药结束后,采用苏木素-伊红(HE)染色法和Masson染色法观察大鼠膝关节软骨组织,行Mankin's评分,酶联免疫吸附分析(ELISA)检测血清白细胞介素(IL)-6、IL-10和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的含量,免疫组织化学法检测软骨组织Ki67的表达,蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测软骨组织Akt、磷酸化Akt(p-Akt)、mTOR、磷酸化mTOR(p-mTOR)、糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β)、磷酸化GSK3 β (p-GSK3 β)和细胞周期蛋白D1(CyclinD1)的表达。【结果】与正常组比较,模型组大鼠膝关节软骨细胞排列紊乱,结构不清晰,Mankin's评分升高($P < 0.05$),血清IL-10含量下降,IL-6和TNF- α 含量升高($P < 0.05$),软骨组织Ki67表达量,p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、p-GSK3 β /GSK3 β 和CyclinD1的相对表达量均显著减少($P < 0.05$)。与模型组比较,千草方组大鼠膝关节软骨表面更加光滑,结构较清晰,软骨基质着色较均匀,Mankin's评分降低($P < 0.05$),血清IL-10含量升高,IL-6和TNF- α 含量降低($P < 0.05$),软骨组织p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、p-GSK3 β /GSK3 β 和CyclinD1的相对表达量显著增加($P < 0.05$)。【结论】千草方熏洗能够通过促进Akt/mTOR信号通路活化及软骨细胞增殖来缓解膝骨关节炎。

关键词: 千草方;熏洗;膝骨关节炎;Akt/mTOR信号通路;软骨;大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)08-1673-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.08.025

Protective Effects of *Qiancao Fang* Fumigation on Cartilage in Rats with Knee Osteoarthritis and Related Mechanism

LI Hong-Jun, SHI Yuan, HE Min, LI Jian, WANG Jun-Jun,
DENG Xin-Chao, LU Mi, ZHANG Hui, WU Yan,
WU Hong-Li, LINAG Ping

(The Eighth Hospital of Wuhan, Wuhan 430010 Hubei, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of *Qiancao Fang* fumigation on protein kinase B(Akt)/mammalian target of rapamycin(mTOR) pathway in cartilage from rats with knee osteoarthritis(KOA), so as to explore the protective effects of *Qiancao Fang* fumigation on cartilage of knee osteoarthritis rats and the related mechanisms. **Methods** Thirty-two SD rats were randomly divided into 4 groups, namely normal group, model group, *Qiancao Fang* group and hyaluronic acid(HA) group, 8 rats in each group. Apart from the normal group, the rats in the other groups were induced into KOA model by the improved Hulth method. After modeling, *Qiancao Fang* group was given fumigation of *Qiancao Fang*, and HA group was given intra-articular injection of HA, the model group had no treatment. The treatment lasted 30 days. After medication, the pathological features of cartilage tissue were observed by haematoxylin-eosin(HE) and Masson staining methods, and Mankin's scoring was carried out, the

收稿日期: 2020-06-08

作者简介: 李宏军(1981-),男,硕士,主治医师;E-mail: 15337263926@163.com

通讯作者: 施源,男,副主任医师,副教授;E-mail: shiyuanshizhanyi@sina.com

基金项目: 武汉市卫计委科研项目(编号: WZ17Q11)

serum levels of interleukin-6(IL)-6, IL-10 and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA), the expression level of Ki67 in cartilage tissue was detected by immunohistochemistry, and the expression levels of Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), mTOR, phosphorylated mTOR (p-mTOR), glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β), phosphorylated GSK3 β (p-GSK3 β) and CyclinD1 in cartilage tissue were detected by Western blotting assay. **Results** Compared with the normal group, the cartilage cells in knee joint were disordered and cartilage structure were not clear in the model group, the Mankin's scores were enhanced ($P < 0.05$), serum IL-10 content was decreased, serum IL-6 and TNF- α contents were increased ($P < 0.05$), and the expression level of Ki67 and relative expression levels of p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, p-GSK3 β /GSK3 β and CyclinD1 in cartilage tissue were lowered ($P < 0.05$). Compared with the model group, the cartilage surface of knee joint was smoother, the cartilage structure was clearer, and the cartilage matrix was evenly colored in the *Qiancao Fang* group, the Mankin's scores were decreased, the serum IL-10 content was increased, the serum IL-6 and TNF- α contents were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of Ki67 and relative expression levels of p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, p-GSK3 β /GSK3 β and CyclinD1 in cartilage tissue were raised ($P < 0.05$). **Conclusion** *Qiancao Fang* has effects on relieving KOA through promoting activation of Akt/mTOR pathway and proliferation of cartilage cells.

Keywords: *Qiancao Fang*; fumigation; knee osteoarthritis; Akt/mTOR signaling pathway; cartilage; rats

膝骨关节炎(knee osteoarthritis)属老年性退行性关节疾病,其病理特征除表现为关节软骨的损伤和损失外,还合并有关节下骨的重塑、骨赘形成、韧带松弛、关节周围肌肉减弱等病变,并在一些病例中存在滑膜炎^[1]。本课题组前期研究表明,千草方熏洗联合关节内注射透明质酸(hyaluronic acid)能够有效缓解膝骨关节炎,降低膝骨关节炎的炎症因子水平,延缓关节软骨的破坏^[2-3],但有关千草方熏洗治疗膝骨关节炎的具体机制尚不明确。因此,本研究构建了膝骨关节炎大鼠模型,观察千草方熏洗对大鼠膝骨关节炎的治疗作用及其机制,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 10周龄SPF级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠32只,体质量(300~350)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物质量合格证号:11401300043471。动物实验方案通过武汉市第八医院动物伦理委员会批准。大鼠饲养于SPF环境中,温度为22~26℃,相对湿度为50%~60%,12h明暗光源,自由饮水和进食。

1.2 药物、试剂与仪器 千草方组成:千年健30g、鹿衔草30g、透骨草20g、伸筋草20g、防

风20g、木防己20g、丹参20g、牛膝20g。中药材由武汉市中医医院中药房提供。透明质酸钠购自山东正大福瑞达制药有限公司(国药准字H10960136)。米醋(江苏恒顺醋业股份有限公司);白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒,Masson染色试剂盒均购自Bio-Swamp(中国);兔抗Ki67、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化mTOR(p-mTOR)、磷酸化糖原合成酶激酶3 β (p-GSK3 β)、细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、 β -actin等抗体及小鼠抗糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β)抗体均为英国Abcam公司产品。DHG-9023A恒温烘箱(上海恒一科学仪器有限公司);MD1000光学显微镜(徕卡显微系统有限公司);Tanon-5200全自动化学发光分析仪(上海天能公司);352型酶标仪(芬兰Labsystems Multiskan MS公司)。

1.3 分组与造模 适应性饲养1周后,按照随机数字表将32只SD大鼠随机分为正常组、模型组、千草方组和透明质酸钠组,每组8只。除正常组外,其他3组大鼠采用改良Hulth法^[4]建立膝骨关节炎模型。造模方法:腹腔注射2mL/kg戊巴比妥钠(30g/L)麻醉大鼠,于无菌条件下切除大鼠右膝

内侧半月板及内侧副韧带,术后向大鼠肌内注射20 U青霉素以预防感染,每天1次,连续3 d。正常组大鼠,不做额外处理。

1.4 给药 千草方组于动物模型制备后,将千草方置于蒸发器内,加水至2~2.5 kg,加米醋50 mL,制成浓度为10%的药液,接通电源加热,产生蒸汽,温度为40~45℃。将患膝(熏洗部位以膝关节髌骨为中心,上下各约3 cm)置蒸汽上,每日1次,每次30 min,连续熏洗30次。透明质酸钠组于动物模型制备后的第1周开始关节内注射0.4 mL/kg透明质酸^[2],其后每周重复注射1次,共干预5次。模型组和正常组不给予任何治疗处理。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 酶联免疫吸附分析(ELISA) 给药结束后,于腹主动脉穿刺取血,收集血清。取40 μL待测样品于酶标板孔中,分别加入IL-6、IL-10和TNF-α抗体10 μL,轻轻摇晃。每孔加入50 μL酶标试剂,室温下孵育30 min,洗涤液洗涤5次后,加入显色试剂混匀,避光显色10 min,加入50 μL终止液终止反应,应用酶标仪测定各孔450 nm波长处的吸光度值。根据标准曲线计算IL-6、IL-10和TNF-α的浓度。

1.5.2 苏木素-伊红(HE)染色法 将膝关节标本置于100 g/L多聚甲醛中固定48 h后,放入20% EDTA液中并于4℃冰箱内脱钙4周,每3 d换脱钙液1次。然后,进行常规石蜡包埋和切片。切片脱蜡脱水后进行常规HE染色。苏木素染核15 min,流水冲洗,0.5%伊红染液3 min,流水冲洗。光学显微镜下观察软骨组织病理变化,使用Mankin's法对关节软骨组织损伤进行评分^[5-6]。

1.5.3 Masson染色法 按照Masson染色试剂盒说明书进行染色。方法:将膝关节石蜡切片置于苏木素三氯化铁混合液(1:1)中染色10 min,流水冲洗后,置于丽春红酸性复红液中浸染5~10 min,2%冰醋酸水溶液浸洗,1%磷钼酸水溶液分化5 min后,将切片放入苯胺蓝水溶液染5 min,2%冰醋酸水溶液浸洗。梯级浓度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,光学显微镜下观察。

1.5.4 免疫组织化学法 取膝关节组织石蜡切片常规脱蜡脱水后,于65℃恒温箱中烤片1 h,用0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液高压修复15 min,然后加入3% H₂O₂以消除内源性过氧化物酶,滴加一抗

Ki67(1:200)孵育过夜,滴加生物素标记的二抗,滴加二氨基联苯胺(DAB)溶液,苏木素复染3 min,1%盐酸酒精分化,并于显微镜下观察控制染色程度。常规脱水,透明,干燥后,于光学显微镜下观察。

1.5.5 蛋白免疫印迹(Western Blot)法 采用放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液提取膝关节软骨总蛋白,12 000×g于4℃离心15 min后,取上清液进行蛋白质浓度测定。然后用12%的分离胶、5%的浓缩胶进行蛋白质电泳,90 V转膜50 min,以50 g/L脱脂奶粉室温下封闭2 h,洗涤,加入p-Akt(1:500稀释),4℃孵育过夜,洗涤,加入对应的二抗,室温孵育2 h后,将膜放置在暗室中,加入电化学发光(ECL)试剂显影,最后将膜置于全自动化学发光分析仪中检测。Akt(1:500)、p-mTOR(1:1 000)、mTOR(1:2 000)、p-GSK3β(1:1 000)、GSK3β(1:1 000)、CyclinD1(1:10 000)、β-actin(1:2 500)检测方法同上。

1.6 统计方法 采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清炎症因子IL-6、IL-10、TNF-α的含量变化比较 表1的结果显示:与正常组比较,模型组血清IL-6和TNF-α的含量显著增加,模型组IL-10的含量显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,千草方组和透明质酸钠组血清IL-6和TNF-α的含量显著降低($P < 0.05$),IL-10的含量显著增加($P < 0.05$);但千草方组血清IL-6和TNF-α的含量高于透明质酸钠组($P < 0.05$),IL-10的含量明显低于透明质酸钠组($P < 0.05$)。

2.2 各组软骨组织形态学比较 图1、2结果显示:正常组软骨表面光滑,软骨基质着色均匀,各层细胞排列整齐,结构清晰,潮线完整。模型组软骨表面粗糙破损,表层软骨糜烂、剥落,软骨基质着色不均匀,各层细胞排列紊乱,四层结构不清晰。与模型组比较,千草方组软骨表面更加光滑,虽然存在着软骨细胞的减少,结构较清晰,软骨基质着色较均匀。透明质酸钠组的软骨组织,也存在着软骨细胞的减少,与模型组比较,

表1 各组血清IL-6、IL-10、TNF- α 的含量变化比较Table 1 Comparison of the serum contents of IL-6, IL-10, TNF- α in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	IL-6($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-10($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常组	8	21.09 $\pm$ 2.45	24.86 $\pm$ 3.22	24.28 $\pm$ 2.78
模型组	8	54.72 $\pm$ 3.11 ^①	4.12 $\pm$ 1.17 ^①	58.26 $\pm$ 2.93 ^①
千草方组	8	33.93 $\pm$ 2.66 ^{②③}	9.14 $\pm$ 1.50 ^{②③}	36.79 $\pm$ 3.66 ^{②③}
透明质酸组	8	27.61 $\pm$ 2.47 ^②	16.15 $\pm$ 2.82 ^②	31.31 $\pm$ 2.36 ^②

① $P < 0.05$, 与正常组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较; ③ $P < 0.05$, 与透明质酸组比较

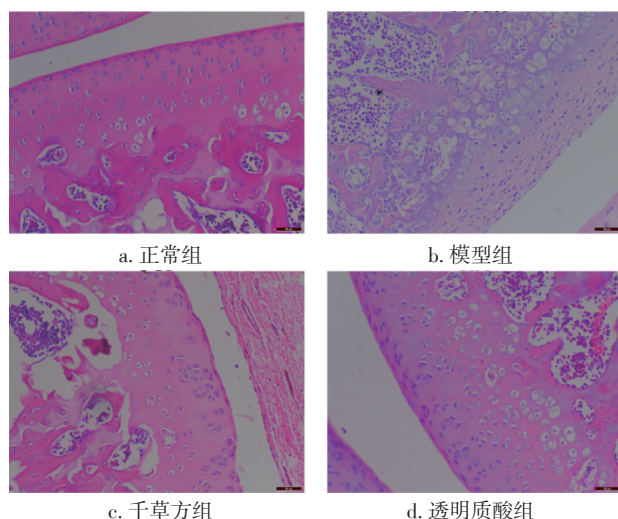


图1 各组软骨组织HE染色结果比较(×200)

Figure 1 Comparison of HE staining results of cartilage tissue in various groups(×200)

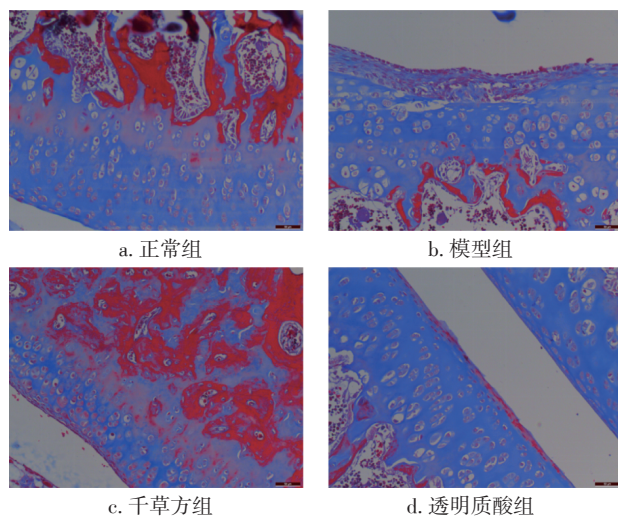


图2 各组软骨组织Masson染色结果比较(×200)

Figure 2 Comparison of Masson staining results of cartilage tissue in various groups(×200)

结构较为完整和清晰。

2.3 各组关节软骨组织损伤Mankin's评分比较 表2结果显示: 与正常组比较, 模型组Mankin's评分

表2 各组关节软骨组织损伤Mankin's评分比较

Table 2 Comparison of Mankin's scores for cartilage tissue injury in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	Mankin's评分(分)
正常组	8	1.67 $\pm$ 0.82
模型组	8	7.50 $\pm$ 1.05 ^①
千草方组	8	5.17 $\pm$ 1.47 ^{②③}
透明质酸组	8	3.17 $\pm$ 0.75 ^②

① $P < 0.05$, 与正常组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较; ③ $P < 0.05$, 与透明质酸组比较

值显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较, 千草方组和透明质酸组Mankin's评分值显著降低($P < 0.05$); 但千草方组Mankin's评分值明显高于透明质酸组($P < 0.05$)。

2.4 各组软骨组织Ki67表达比较 图3结果显示, 模型组软骨组织Ki67表达量低于正常组($P < 0.05$), 千草方组和透明质酸组Ki67的表达量高于模型组($P < 0.05$), 而2个治疗组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 各组软骨组织Akt、mTOR、GSK3 β 磷酸化水平, CyclinD1蛋白相对表达量比较 图4结果显示: 与正常组比较, 模型组软骨组织p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、p-GSK3 β /GSK3 β 和CyclinD1的相对表达量显著减少($P < 0.05$)。与模型组比较, 千草方组和透明质酸组软骨组织p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、p-GSK3 β /GSK3 β 和CyclinD1的相对表达量均显著上升($P < 0.05$); 但千草方组软骨组织p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、p-GSK3 β /GSK3 β 和CyclinD1的相对表达量显著低于透明质酸组($P < 0.05$)。

3 讨论

膝骨关节炎属中医“痹证”范畴, 主要因肾

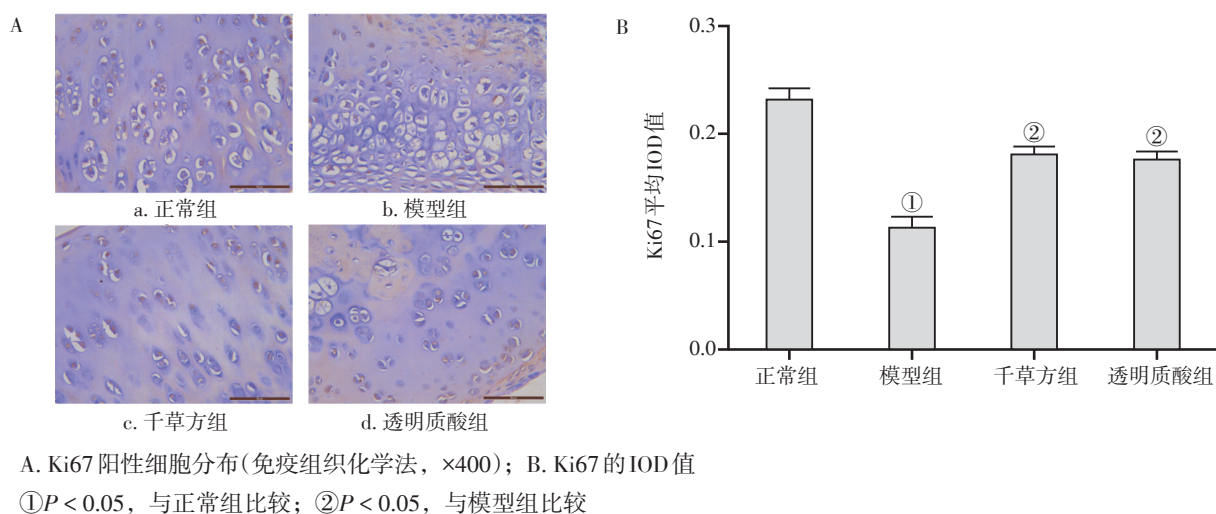


图3 各组软骨组织Ki67表达比较

Figure 3 Comparison of the expression of Ki67 in cartilage tissue of various groups

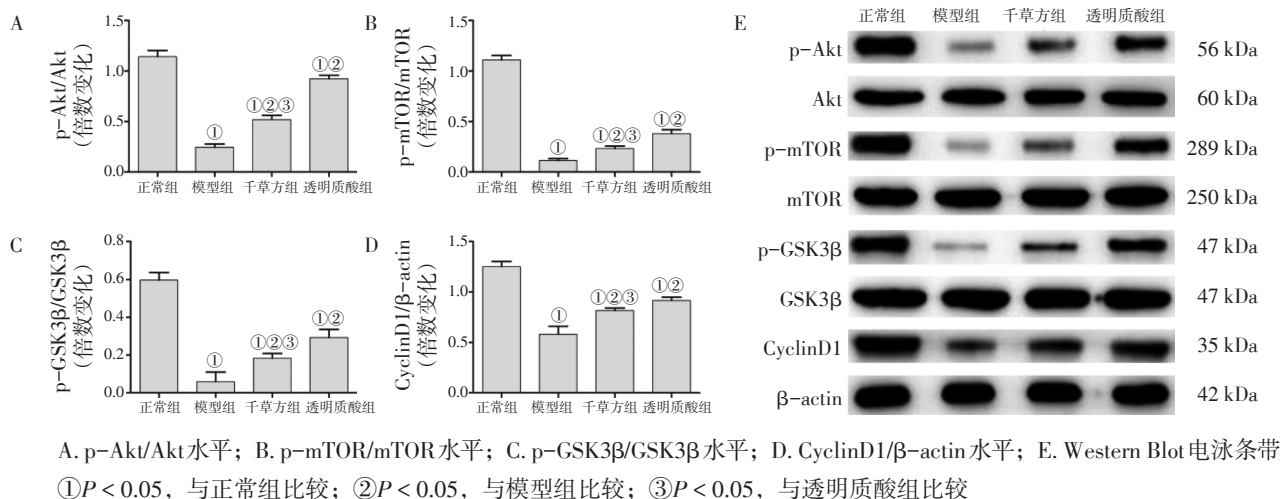


图4 各组软骨组织Akt、mTOR、GSK3β磷酸化水平, CyclinD1蛋白相对表达量比较

Figure 4 Comparison of the phosphorylated expression levels of Akt, mTOR, GSK3β and relative expression level of CyclinD1 in cartilage tissue of various groups

虚复感风、寒、湿邪导致瘀血阻滞关节筋络发为本病,其病机主要为肾虚血瘀、经络痹阻,为“本虚标实”之证。本课题组在治疗该病上采用具有散寒祛湿、发汗解表、疏通膜理、调和气血、舒经活络功效的千草方进行局部熏洗,可达到缓解膝部疼痛、修复膝关节活动功能,抑制退行性变进一步发展的目的。

膝关节炎的主要病理表现为关节软骨变性、脱落和炎性因子沉积^[7]。IL-6、IL-10、TNF-α是骨关节炎病理过程中介导关节软骨破坏最重要的细胞因子^[8]。本研究HE染色、Markin's评分和血清IL-6、IL-10和TNF-α的结果表明,成功构建了膝关节炎大鼠模型。经关节腔内注射透明

质酸或千草方熏洗治疗后,软骨组织结构的破坏和炎性浸润等病理改变能够得到缓解。

Ki67是代表细胞增殖的关键基因之一,普遍认为Ki67的表达与细胞增殖呈正相关^[9]。研究^[10]发现, Ki67高表达可促进人骨关节炎软骨细胞的增殖。还有研究^[11]表明,促进Ki67的表达可减少TNF-α、IL-7和IL-23的分泌,从而降低骨关节炎大鼠软组织损伤和炎症反应。CyclinD1是细胞周期调控的关键基因, CyclinD1的表达抑制会导致细胞周期的阻滞^[12]。本研究结果显示,膝关节炎模型大鼠软骨中Ki67和CyclinD1表达量较正常组明显下降,经千草方熏洗后,软骨Ki67和CyclinD1表达量较模型组显著升高,提示千草方能够降低膝

骨关节炎软骨细胞的周期阻滞,促进软骨组织细胞增殖。

Akt/mTOR 信号通路是调控细胞生长和增殖的关键途径,对细胞的生长、增殖、存活、凋亡以及血管的生成和自噬等起到十分重要的作用^[13]。研究^[14-16]表明, Akt/mTOR 信号通路与骨关节炎关系密切,激活 Akt/mTOR 通路可以减轻关节软骨的炎症反应。有研究^[17]结果显示,膝骨关节炎大鼠软骨组织 Akt 和 mTOR 的表达量显著高于正常组。而下调 GSK3 β 可保护软骨细胞^[18]。另外,蛋白质磷酸化是生物界最普遍,也是最重要的一种蛋白质翻译后修饰,是一种动态的生物调节过程。蛋白磷酸化与多种生物学过程如 DNA 损伤修复、转录调节、信号传导、细胞凋亡的调节等密切相关,是调节和控制蛋白质活力和功能的最基本、最普遍,也是最重要的机制^[19-20]。本研究结果显示:模型组软骨组织 Akt、mTOR、GSK3 β 的磷酸化水平较正常组显著降低($P < 0.05$);经千草方熏洗治疗后, Akt、mTOR、GSK3 β 的磷酸化水平较模型组显著升高($P < 0.05$)。提示千草方熏洗可能是通过调节 Akt、mTOR、GSK3 β 的磷酸化水平发挥抗膝骨关节炎的作用。

综上所述,千草方熏洗在一定程度上能够缓解膝骨关节炎,其分子机制可能与促进软骨组织 Akt/mTOR 信号通路蛋白的活化,进而促进软骨细胞增殖有关。

参考文献:

- [1] CROSS M, SMITH E, HOY D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [2] 丑钢,张劲,周俊,等.透明质酸钠注射配合中药熏洗对膝骨关节炎炎症因子影响的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2009, 17(1): 23-25.
- [3] 张劲,丑钢,周俊,等.透明质酸钠注射配合千草方熏洗对膝骨关节炎关节软骨的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2008, 16(10): 22-23.
- [4] HULTH A, LINDBERG L, TELHAG H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report [J]. *Acta Orthop Scand*, 1970, 41(5): 522-530.
- [5] 周颖燕,徐侦雄,林洁华,等.熟地寄生壮骨方对膝骨关节炎模型大鼠关节软骨形态的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(4): 711-714.
- [6] MANKIN H J, LIPPIELLO L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1970, 52(3): 424-434.
- [7] KATZ J N, THORNHILL T S. Knee osteoarthritis [M]. *Principles of Orthopedic Practice for Primary Care Providers*, 2018: 269-278.
- [8] 杜津莉,樊炜骏,李建,等.独活寄生汤含药血清对膝关节 OA 大鼠滑膜细胞 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10 表达的影响及其机制[J]. *山东医药*, 2017, 57(44): 14-17.
- [9] GOODLAD R A. Quantification of epithelial cell proliferation, cell dynamics, and cell kinetics *in vivo* [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2017, 6(4). DOI: 10.1002/wdev.274.
- [10] 董良杰,王勤俭,王单一,等.白芍总苷对人骨关节炎软骨细胞增殖及 p38MAPK 蛋白表达的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2019(54): 431-435.
- [11] 丁童,周彦鹏,冯立平.红景天苷对骨关节炎大鼠软组织损伤和免疫失衡的调节作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2020, 37(3): 268-274.
- [12] QIU Y S, JIANG N N, ZHOU Y, et al. LMO3 promotes gastric cancer cell invasion and proliferation through Akt-mTOR and Akt-GSK3 β signaling[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2755-2763.
- [13] ERSAHIN T, TUNCBAG N, CETIN-ATALAY R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7): 1946-1954.
- [14] HE W, CHENG Y. Inhibition of miR-20 promotes proliferation and autophagy in articular chondrocytes by PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 607-615.
- [15] 阮丽萍,刘健,葛瑶,等.骨关节炎大鼠软骨 PI3K/Akt-mTOR 及 Beclin-1 自噬通路的表达及相关性分析[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2015, 44(4): 429-433, 439.
- [16] 姚旭,王清华,茹艺,等.芍药苷抑制 PI3K/AKT 信号促进细胞自噬治疗骨关节炎[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(8): 1076-1079.
- [17] 李晓燕,张艳,董春萍,等.骨关节炎大鼠模型软骨组织中 PI3K/AKT 信号通路功能与细胞凋亡的相关性研究[J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(11): 1452-1455.
- [18] YUAN X, LI L, SHI W, et al. TMF protects chondrocytes from ER stress-induced apoptosis by down-regulating GSK-3 β [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1262-1268.
- [19] YOSHIMI A, KUROKAWA M. Evi1 forms a bridge between the epigenetic machinery and signaling pathways [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(7): 575-586.
- [20] LIAO Y, HUNG M C. Physiological regulation of Akt activity and stability[J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(1): 19-42.

【责任编辑:侯丽颖】