

尼古丁抑制 MIA 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡

韩贵宾, 张 寿, 孙薇薇, 钟海波, 陈建强, 范忠诚

(海口市人民医院骨科中心, 海口 570208)

【摘要】 目的 探讨尼古丁抑制碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡。**方法** 酶消化法分离大鼠原代软骨细胞,并用 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 尼古丁处理细胞 48 h,随后实验分为 5 组,除正常组外,其余 4 组皆用 4 μ M MIA 处理 24 h,并给予尼古丁。MTT 法检测各组软骨细胞活力;Annexin V-FITC/PI 流式双染细胞术检测各组软骨细胞凋亡;分光光度法检测各组软骨细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase 3)活性;Western blot 分析磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)激活状况及下游靶分子 Bax, Bcl-2 的表达情况。**结果** 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 尼古丁显著促进大鼠软骨细胞活力($P < 0.05$), 10^{-5} mol/L 尼古丁显著降低大鼠软骨细胞活力($P < 0.05$), 10^{-8} mol/L 尼古丁对大鼠软骨细胞活力无影响($P > 0.05$)。 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 尼古丁能剂量依赖性的提高 MIA 诱导的大鼠软骨细胞活力,并抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞凋亡及 Caspase 3 活性($P < 0.05$); 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 尼古丁能提高 PI3K 表达及 AKT 磷酸化水平,并下调促 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达($P < 0.05$)。**结论** 一定剂量尼古丁能显著的抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞凋亡,可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。

【关键词】 关键词 尼古丁;骨关节炎;软骨细胞;凋亡

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0040-00

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.009

Inhibition of nicotine on apoptosis of chondrocytes induced by monosodium iodoacetate

HAN Gui-bin, ZHANG Shou, SUN Wei-wei, ZHONG Hai-tao,
CHEN Jian-qiang, FAN Zhong-cheng

【Abstract】 Objective To explore inhibition of nicotine on apoptosis of chondrocytes induced by monosodium iodoacetate (MIA). **Methods** Rat primary chondrocytes were isolated by enzyme digestion, and the cells were treated with 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L nicotine for 48 h. The cases were randomly divided into five groups, except for normal group, the other four groups were treated with 4 μ mol/L MIA 24 h, and three groups were treated 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L nicotine. The viability of chondrocytes was detected by MTT assay. The apoptosis of chondrocytes was examined by Annexin V-FITC/PI flow dual-staining method. The activity of cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Caspase 3) was measured by spectrophotography method. The activation of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) and the expression of down-stream molecule Bax, Bcl-2 was assayed by western blot. **Results** 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L nicotine increased chondrocytes' viability ($P < 0.05$), 10^{-5} mol/L nicotine reduced chondrocytes' viability ($P < 0.05$), and 10^{-8} mol/L nicotine didn't effect on chondrocytes' viability ($P > 0.05$). 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L nicotine could increase

【基金项目】 海南省卫生厅基金资助项目(琼卫-2013 资助-036 号)。

【作者简介】 韩贵宾(1974-),男,硕士,副主任医师,研究方向:关节外科。E-mail:hanguibin456@163.com。

【通讯作者】 张寿,Email:shouzhang456@163.com。

MIA-induced chondrocytes' viability ($P < 0.05$), suppress MIA-induced chondrocytes' apoptosis and the activity of MIA-induced Caspase 3 ($P < 0.05$). Moreover, 10^{-7} , 10^{-6} mol/L nicotine could increase the expression of PI3K and phosphorylation of AKT ($P < 0.05$), down-regulate the expression of Bax and up-regulate the expression of Bcl-2 in MIA-induced rat chondrocytes ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggested nicotine could exert anti-apoptosis in MIA-induced rat chondrocytes, which might be related to PI3K/AKT signal pathway.

[Key words] Nicotine; Osteoarthritis; Chondrocytes; Apoptosis

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种慢性退行性骨关节疾病,其中软骨病变是骨关节炎的中心环节^[1]。软骨细胞是软骨中唯一细胞结构,一旦软骨细胞死亡,只能缓慢再生甚至无法再生,而软骨细胞的死亡又破坏了胞外基质合成及降解的平衡,从而进一步加剧 OA^[2]。软骨细胞的凋亡受多种信号通路调节,其中包括 PI3K/AKT,此通路的持续激活,能使软骨细胞维持增殖活力,并调节下游靶基因 Bax, Bcl-2 及 Caspase 3 的表达^[3]。

一定剂量尼古丁能显著促进包括软骨细胞在内的多种细胞的增殖活力。如 Liu 等^[4]报道在碘乙酸钠 (MIA) 诱导的骨关节炎大鼠中,尼古丁通过与乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 结合,从而改善大鼠大体及病理形态,并抑制大鼠软骨细胞凋亡。Zheng 等^[5]通过 MTT 及 DAPI 实验证实 10^{-7} M 尼古丁能显著抑制白介素-1 β (IL-1 β) 诱导的大鼠软骨细胞凋亡。但尼古丁对于软骨细胞凋亡的抑制作用机制尚未见报道,因此本文旨在考察尼古丁是否能通过 PI3K/AKT 信号通路从而阻断 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

尼古丁购自美国 sigma 公司,批号:4408;兔抗 Bax, Bcl-2, PI3K, AKT, p-AKT, GDAPH 抗体购自 Epitomics 公司;Annexin V-FITC/PI 流式双染细胞, Caspase 3 检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;胎牛血清, DMEM/F-12 培养基, 二型胶原酶, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自 Gibco 公司。

1.2 大鼠软骨细胞的制备^[6]

无菌环境下,刮取 100 g 左右 SD 大鼠 (购于上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK (沪 2012 - 0002)】) 双侧膝关节胫骨坪、髌骨内侧透明软骨,剪碎至 1 mm³ 大小。依次用 0.25% 的胰蛋白酶及 0.2% 的胶原酶消化。得到单细胞悬液,用 DMEM/F-12 培养基重悬细胞 (含 20% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素), 在 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中培养, 约 5~6 d 细胞开始融合, 实验使用第 2

~3 代细胞。

1.3 软骨细胞活力检测 (MTT 法)

将第 2~3 代软骨细胞进行消化,并调整细胞浓度为 1×10^5 个细胞/mL, 接种, 于 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。加入含 5% 胎牛血清的 DMEM/F-12 (含 4 μ mol/L MIA 及 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L 尼古丁) 培养基, 继续培养 24 h, 每孔加 MTT (5 mg/mL) 20 μ L, 4 h 后, 弃上清, 并每孔加入 DMSO 150 μ L, 10 min 后, 酶标仪 570 nm 处测定 OD 值, 以 OD 值代表细胞活力。

1.4 Annexin V-FITC 流式细胞法检测软骨细胞凋亡

将第 2~3 代软骨细胞进行消化, 调整细胞浓度为 2×10^5 个细胞/mL, 接种, 于 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。加入含 5% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基、尼古丁 (终浓度为 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L) 和 MIA (终浓度为 4 μ mol/L), 继续培养 48 h 后, 按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法, 用 0.25% 的胰蛋白酶 (不含 EDTA) 消化, PBS 洗涤, 2000 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 加入 Binding Buffer 500 μ L 悬浮细胞, 随后加入 Annexin V-FITC 5 μ L 混匀后, 加入 PI 5 μ L, 混匀, 于室温避光反应 5~15 min, 在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.5 Caspase 3 活性检测

将第 2~3 代软骨细胞进行消化, 调整细胞浓度为 2×10^5 个细胞/mL, 接种, 于 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。加入含 5% 小牛血清的 DMEM/F-12 培养基、尼古丁 (终浓度为 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L) 和 MIA (终浓度为 4 μ mol/L), 继续培养 48 h。按 Caspase 3 分光光度法检测试剂盒进行检测。

1.6 Western blotting

收集处理过的样本, 加入裂解液裂解, 离心, 获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样, 跑 SDS 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 加入一抗 4℃ 孵育过夜。次日加二抗孵育后曝光。用 “Quantity One” 软件对各蛋白条带灰度值进行统计。

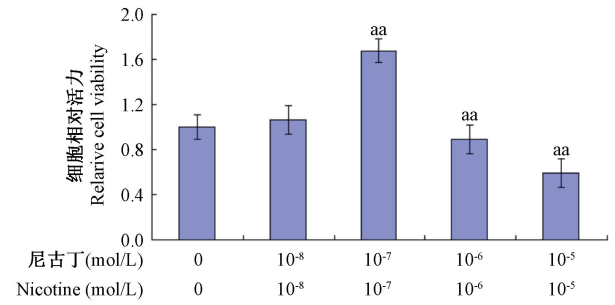
1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,分析组间差异的显著性。 $P < 0.05$ 时表示两组间差异在统计学上有显著性意义。

2 结果

2.1 尼古丁对大鼠软骨细胞活力的影响

如图 1 所示, 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著提高软骨细胞活力,差异具有统计学意义($P < 0.01$);而 10^{-5} mol/L 尼古丁对软骨细胞活力具有显著抑制作用,差异具有统计学意义($P < 0.01$); 10^{-8} mol/L 尼古丁对软骨细胞活力影响不大($P > 0.05$)。



注:与正常组比较, ^{aa} $P < 0.01$ 。

图 1 尼古丁对大鼠软骨细胞活力的影响

Note: Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$.

Fig.1 Effect of nicotine on rat chondrocytes viability

2.2 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响

如图 2 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著抑制软骨细胞活力,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著提高 MIA 诱导的软骨细胞活力,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞凋亡的影响

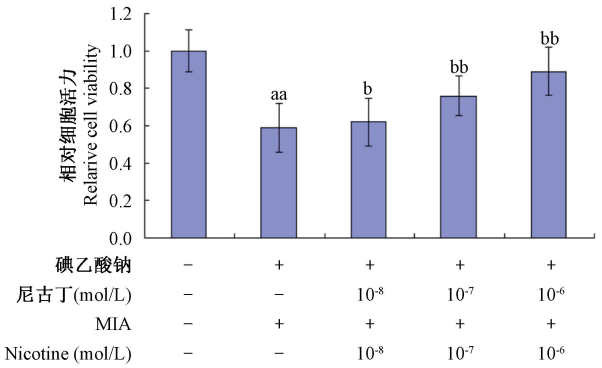
如图 3 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著促进软骨细胞凋亡,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

2.4 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响

如图 4 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著抑制 PI3K 表达和 AKT 的磷酸化程度,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能提高 PI3K 表达, 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能提高 AKT 磷酸化水平,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Bax 及 Bcl-2 表达的影响

如图 5 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著提高 Bax 表达,抑制 Bcl-2 表达,而 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能



注:与正常组比较, ^{aa} $P < 0.05$;与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。

图 2 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响

Note: Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$;

Compared with model group, ^{bb} $P < 0.01$.

Fig.2 Effect of nicotine on viability of rat chondrocytes induced by MIA

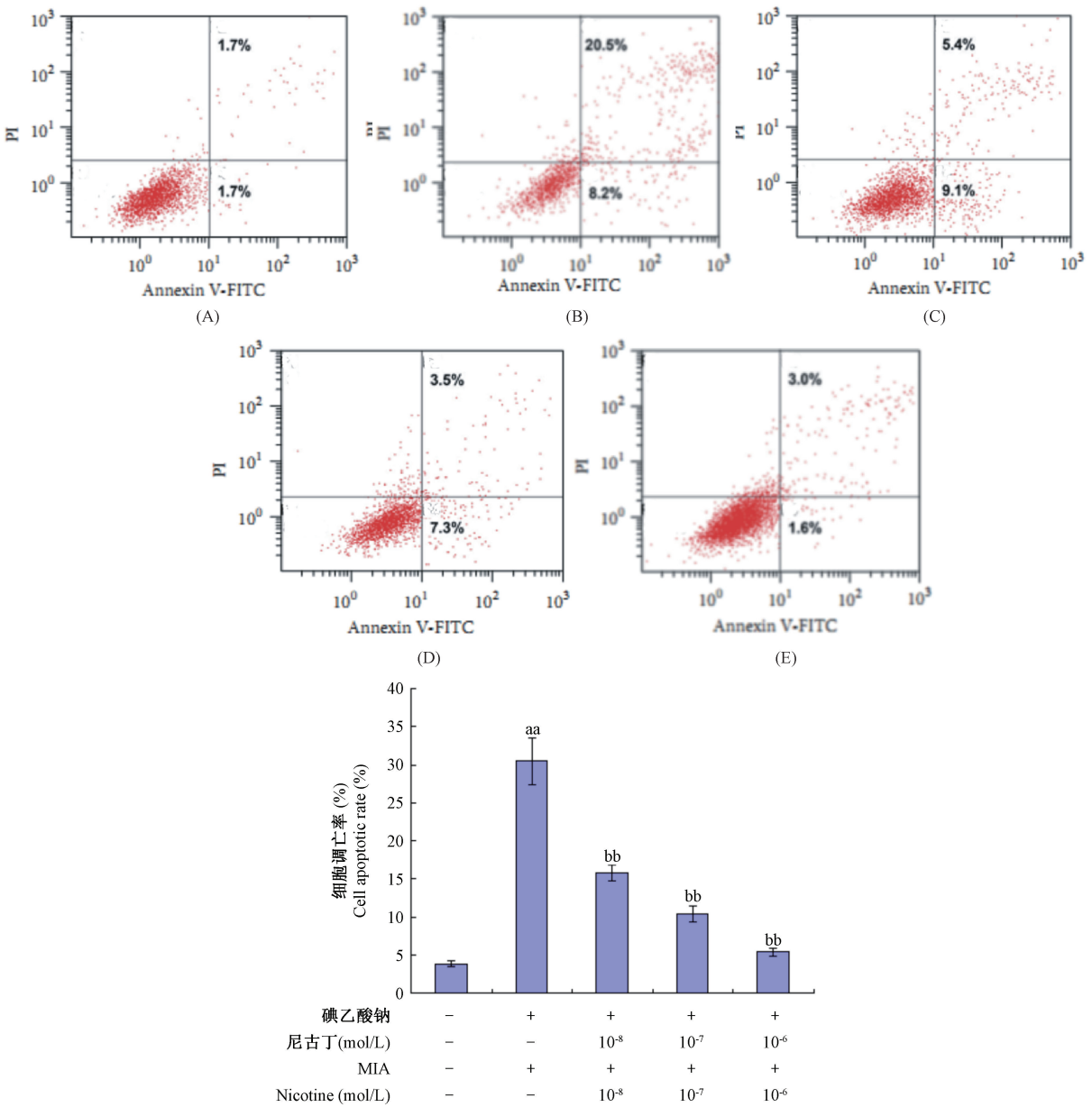
下调 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Caspase 3 活性的影响

如图 6 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著提高软骨细胞 Caspase 3 活性,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著抑制 MIA 诱导的软骨细胞 Caspase 3 活性,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 结论

Ying 等^[7]研究结果表明 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能促进骨髓干细胞增殖并向软骨细胞分化,并随着时间延长能逐渐诱导二型胶原蛋白的表达,而 10^{-5} mol/L 尼古丁可显著的抑制骨髓干细胞增殖。Schraufstatter 等^[8]报道 10^{-5} mol/L 尼古丁会导致人间充质干细胞的凋亡。说明不同剂量尼古丁对细胞增殖活力影响具有显著差异,本实验研究表明 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著提高软骨细胞活力,而 10^{-5} mol/L 尼古丁对软骨细胞活力具有显著抑制作用,与上述报道一致,说明在一定浓度范围内尼古丁对大鼠软骨细胞增殖具有显著促进作用。而多种因素可引起软骨细胞损伤乃至死亡,如软骨表面应力异常,细胞因子(如 IL-1 β 、TNF- α 等)的作用,NO、能量代谢抑制剂(如 MIA)等。其中 MIA 为糖酵解途径中 3-磷酸甘油醛脱氢酶抑制剂,通过抑制细胞能量代谢而导致细胞因供养不足而死亡^[9]。MIA 体外刺激 24 h,亦能造成大鼠软骨细胞的死



注:与正常组比较,^{aa}*P* < 0.05;与模型组比较,^{bb}*P* < 0.01。A:正常组;B:模型组(4 μmol/L MIA); C:10⁻⁸ mol/L 尼古丁 + 4 μmol/L MIA;D:10⁻⁷ mol/L 尼古丁 + 4 μmol/L MIA;E:10⁻⁶ mol/L 尼古丁 + 4 μmol/L MIA。

图3 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞凋亡的影响

Note:Compared with normal control group, ^{aa}*P* < 0.01; Compared with model group, ^{bb}*P* < 0.01. A: normal control group; B: model group; C: 10⁻⁸ mol/L nicotine + 4 μmol/L MIA; D: 10⁻⁷ mol/L nicotine + 4 μmol/L MIA; E: 10⁻⁶ mol/L nicotine + 4 μmol/L MIA.

Fig.3 Effect of nicotine on apoptosis of rat chondrocytes induced by MIA

亡^[10-11]。本实验亦表明 MIA 诱导 24 h 会降低软骨细胞活力,并使细胞凋亡显著。且 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ mol/L 尼古丁能显著抑制 MIA 诱导的细胞凋亡作用,与 Zheng 等^[5]观点一致。

正常生理状态下,关节软骨细胞凋亡与增殖处于动态平衡,而在 OA 等病理状态下,软骨细胞凋亡占主要方面,且关节软骨细胞凋亡的异常会引起 OA。PI3K/AKT 信号通路在 OA 软骨细胞凋亡的发

生发展过程中起着重要的作用^[3]。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,具有脂类激酶活性和蛋白激酶活性,其代谢产物 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)和 1,4,5-三磷酸肌醇(PIP3)可以激活 AKT 蛋白上的丝氨酸或苏氨酸磷酸化位点,从而调节细胞增殖和凋亡相关基因的表达。PI3K/AKT 信号通路调节众多靶分子表达,如 Bax, Bcl-2, Caspase 3 等,调节软骨细胞凋亡活动^[3]。PI3K 抑制剂 LY294002 加入到

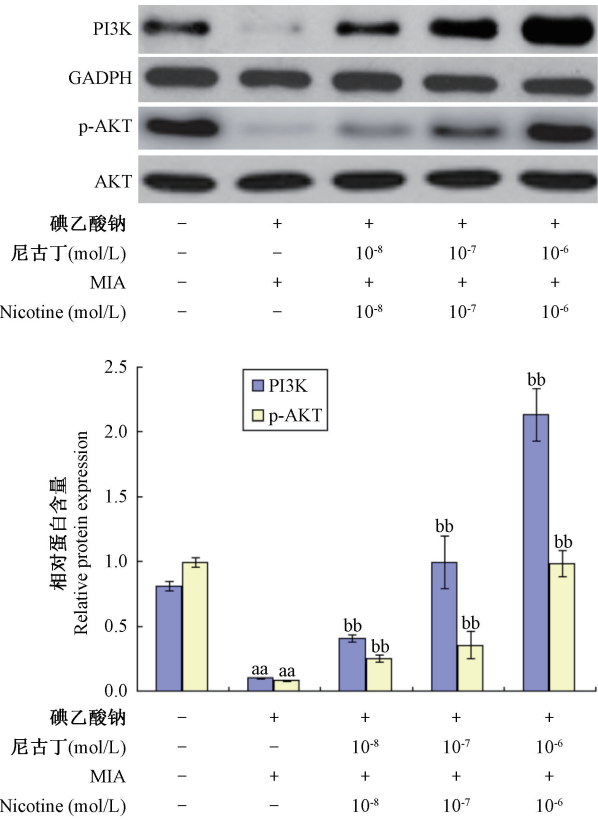


图 4 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响与正常组比较,^{aa} $P < 0.05$; 与模型组比较,^{bb} $P < 0.01$

Fig.4 Effect of nicotine on PI3K/AKT signal pathway in rat chondrocytes induced by MIA Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{bb} $P < 0.01$

大鼠胫骨软骨细胞中,使软骨细胞凋亡数目增多,且软骨细胞生长缓慢^[12]。胰岛素生长因子-1 通过激活软骨细胞 PI3K/AKT 信号通路拮抗软骨细胞凋亡,而 PI3K 抑制剂 LY294002 加入使软骨细胞凋亡数目增加^[13]。这些提示 PI3K/AKT 途径是抗软骨细胞凋亡作用的重要途径。并且李舒洁等^[14]研究表明,MIA 促使大鼠软骨细胞凋亡的同时,伴随着 AKT 磷酸化水平的降低,Bax 表达量的提高及 Bcl-2 表达量的降低。本研究也发现,在 MIA 诱导的 OA 软骨细胞中,PI3K 表达及 AKT 磷酸化程度下降,而 10⁻⁷,10⁻⁶ mol/L 尼古丁显著促进 PI3K 表达及 AKT 磷酸化。Nishioka 等^[15]研究结果也表明尼古丁可通过激活 PI3K/Akt 信号通路来抵抗肺癌细胞凋亡。说明尼古丁可通过 PI3K/AKT 信号通路来抵抗 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

软骨细胞的凋亡受凋亡基因的严格控制,如

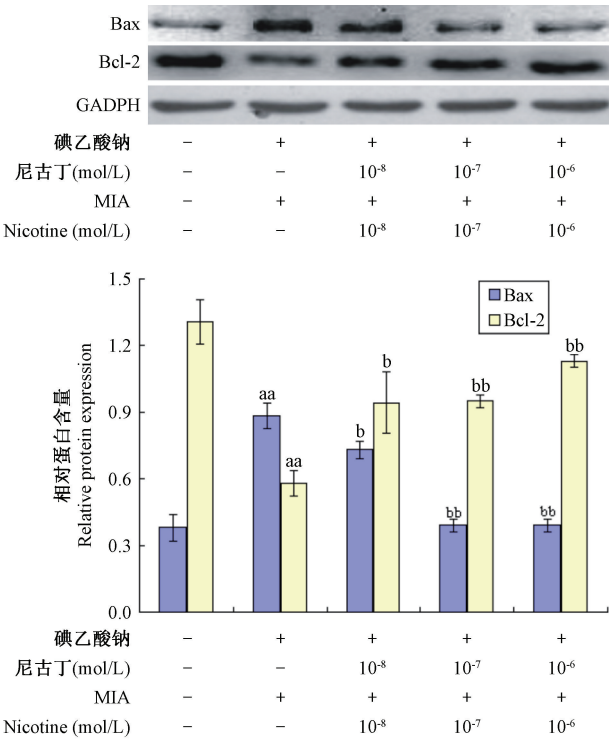


图 5 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Bax 及 Bcl-2 表达的影响与正常组比较,^{aa} $P < 0.05$;与模型组比较,^{bb} $P < 0.01$

Fig.5 Effect of nicotine on the expression of Bax and Bcl-2 in rat chondrocytes induced by MIA Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$

Bcl-2 家族,能与 Bax 亚家族成员,相互作用,启动软骨细胞内的凋亡信号转导。在关节炎患者血清中,Bax 含量显著上升,Bcl-2 含量下降^[16],通过上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达,能显著抑制软骨细胞凋亡^[17],本研究结果也显示 MIA 能上调软骨细胞的 Bax 表达,下调 Bcl-2 表达,而 10⁻⁷,10⁻⁶ mol/L 尼古丁减弱 MIA 诱导的这种变化。Caspase 是一类进化上保守的天冬氨酸蛋白酶家族,依赖 Caspase 的信号途径是细胞凋亡的主要途径。Caspase 3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 或 Ac-DMQD-CHO 在体外证实能抑制由胶原酶引起的软骨细胞凋亡^[18]。碘乙酸钠能诱导大鼠软骨细胞凋亡,与促进 Caspase 3 的活化有关^[19]。本研究发现,在 MIA 诱导的软骨细胞中 Caspase 3 活性显著提高,10⁻⁸,10⁻⁷,10⁻⁶ mol/L 尼古丁可显著降低 Caspase 3 活性。

综上所述,10⁻⁸,10⁻⁷,10⁻⁶ mol/L 尼古丁具有保护软骨细胞作用,可抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡并抑制 Caspase 3 活性,10⁻⁷,10⁻⁶ mol/L 尼古丁

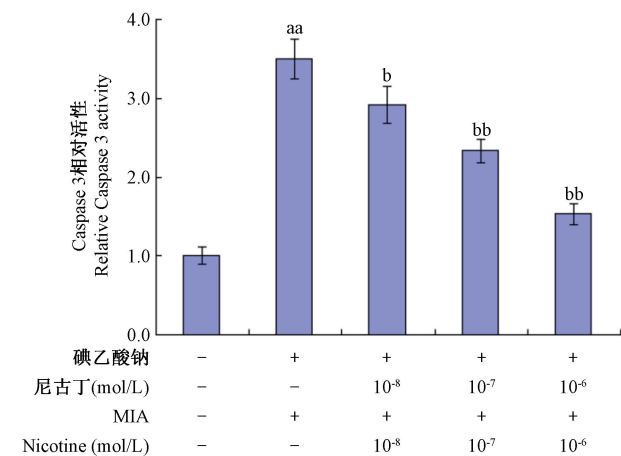


图 6 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Caspase 3 活性的影响与正常组比较,^{aa} $P < 0.05$;
与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$

Fig. 6 Effect of nicotine on the activity of Caspase 3 in rat chondrocytes induced by MIA Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$

可下调 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达,并抑制 PI3K 表达及 AKT 磷酸化水平。

参考文献:

[1] 谢辉晋,杜远立. 骨关节炎相关细胞因子作用机制研究进展 [J]. 重庆医学,2011,40(4):395-398.

[2] Tong P, Xu S, Cao G, *et al.* Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (FuZi) of Aconitum carmichaeli Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 740-744.

[3] Huang Y, Wu D, Fan W. Protection of ginsenoside Rg1 on chondrocyte from IL-1beta-induced mitochondria-activated apoptosis through PI3K/Akt signaling [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1-2): 249-257.

[4] Liu Y, Wu D, Song F, *et al.* Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors prevents monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 627-638.

[5] Zheng X, Xia C, Chen Z, *et al.* Requirement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for the effect of nicotine on interleukin-1beta-induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(3): 606-612.

[6] Zhang X, Xu X, Xu T, *et al.* beta-Ecdysterone suppresses interleukin-1beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF-kappaB signaling pathway [J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3): 195-201.

[7] Ying XZ, Peng L, Cheng SW, *et al.* [Effects of nicotine on bone marrow stromal cells proliferation and differentiation of chondrocyte in vitro] [J]. Zhongguo Gu Shang, 2011, 24(11): 935-938.

[8] Schraufstatter IU, Discipio RG, Khaldoyanidi SK. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells [J]. J Stem Cells, 2009, 4(4): 203-215.

[9] Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Pinzano A, *et al.* Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis [J]. FASEB J, 2006, 20(1): 65-75.

[10] Liu Y, Wu D, Song F, *et al.* Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors prevents monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 627-638.

[11] Tong P, Xu S, Cao G, *et al.* Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (FuZi) of Aconitum carmichaeli Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 740-744.

[12] Ulici V, Hoenselaar KD, Gillespie JR, *et al.* The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation [J]. BMC Dev Biol, 2008, 8: 40.

[13] Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of beta-catenin signaling [J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(5): 1138-1146.

[14] 李淑洁,陈秀娟,任艳红,等. 牛膝提取物对碘乙酸钠诱导的软骨细胞保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14): 132-135.

[15] Nishioka T, Guo J, Yamamoto D, *et al.* Nicotine, through upregulating pro-survival signaling, cooperates with NNK to promote transformation [J]. J Cell Biochem, 2010, 109(1): 152-161.

[16] 邢国胜,赵文君,张凯,等. 姜黄素对类风湿关节炎患者滑膜细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(11):872-875.

[17] Zhang XH, Xu XX, Xu T. Ginsenoside Ro suppresses interleukin-1beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF-kappaB [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(4): 283-289.

[18] Nuttall ME, Nadeau DP, Fisher PW, *et al.* Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in vitro [J]. J Orthop Res, 2000, 18(3): 356-363.

[19] 姜丽平,李龙婕,宫德正,等. 碘乙酸钠诱导原代大鼠软骨细胞凋亡[J]. 中国组织工程研究,2013,17(2):247-253.